

**Untersuchung zur Homöostase
von persistierenden Natrium- und M-Typ Kaliumströmen
in murinen hippokampalen CA1-Pyramidenzellen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

Robert Maresch
aus Köln
2015

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. H. Beck
2. Gutachter: Prof. Dr. med. A. Becker

Tag der Mündlichen Prüfung: 13.10.2015

Aus der Klinik und Poliklinik für Epileptologie
Direktor: Prof. Dr. med. C. E. Elger

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungsverzeichnis	5
1.	Einleitung	7
1.1	Neuronale Plastizität	7
1.2	Homöostase	8
1.3	Feuerverhalten von hippokampalen CA1-Pyramidenzellen	11
1.4	Der persistierende Natriumstrom (I_{NaP})	12
1.5	Der M-Typ Kaliumstrom (I_M)	13
1.6	Fragestellung der vorliegenden Arbeit	14
2.	Material und Methoden	16
2.1	Mausmodelle	16
2.2	Präparation von Hirngewebe für elektrophysiologische Messungen	19
2.3	<i>Whole-cell current-clamp</i> -Messungen	20
2.4	<i>Whole-cell voltage-clamp</i> -Messungen	22
2.5	Immunfluoreszenz-Färbungen	24
2.6	<i>Quantitative real-time reverse-transcription PCR</i>	26
2.7	Datenanalyse und Statistik	28
2.8	Versuchsdurchführung und Datenauswertung	28
3.	Ergebnisse	29
3.1	Der persistierende Natrium- und der M-Typ Kaliumstrom zeigen eine positive Korrelation in CA1-Pyramidenzellen	29

3.2	Reduktion von I_M in einem Mausmodell mit chronisch verminderten I_{NaP} (<i>Scn8a^{med}</i> -Modell)	33
3.3	Unveränderter I_{NaP} in einem Mausmodell mit chronischer I_M -Reduktion durch eine dominant-negative $K_v7.2$ -Untereinheit (<i>P-M2/1</i> -Modell)	37
3.4	Vergrößerter I_{NaP} in einem Modell mit chronischer I_M -Reduktion durch <i>Kcnq2</i> -Deletion (<i>Kcnq2^{flox}</i> -Modell)	41
3.5	Unveränderter I_{NaP} im <i>NMF134^{mut}</i> -Modell	44
3.6	<i>Knockout</i> des <i>Scn1b</i> -Gens hat keinen Einfluss auf I_{NaP} und I_M (<i>Scn1b</i> -Modell)	46
3.7	Axonale Dislokation der $K_v7.2$ -Untereinheit durch ein Ankyrin G-bindendes Peptid hat keinen Effekt auf die Größe von I_{NaP} und I_M in subikulären Pyramidenzellen (<i>Q2-ABP</i> -Modell)	48
4.	Diskussion	54
4.1	Positive Korrelation von I_{NaP} und I_M in hippokampalen CA1-Pyramidenzellen	54
4.2	Reduktion von I_M im <i>Scn8a^{med}</i> -Modell	56
4.3	I_{NaP} in den verschiedenen Mausmodellen zur I_M -Reduktion (<i>P-M2/1</i> -Modell, <i>Kcnq2^{flox}</i> -Modell, <i>NMF134^{mut}</i> -Modell)	59
4.4	Verlust der akzessorischen $\beta 1$ -Kanaluntereinheit und dessen Auswirkungen auf I_{NaP} und I_M (<i>Scn1b</i> -Modell)	60
4.5	Bedeutung der axonalen Lokalisation der $K_v7.2$ -Untereinheit für I_{NaP} und I_M (<i>Q2-ABP</i> -Modell)	62
4.6	Ausblick	64
5.	Zusammenfassung	66
6.	Abbildungsverzeichnis und Tabellenverzeichnis	67
7.	Literaturverzeichnis	68

Abkürzungsverzeichnis

ABP	Ankyrin G-Bindungspeptid
ACSF	Artifizielle zerebrospinale Flüssigkeit
AIS	Axoninitialsegment
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPA	α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionsäure
AP	Aktionspotenzial
4-AP	4-Aminopyridin
ATP	Adenosintriphosphat
AU	Arbitrary unit
BAPTA	1,2-Bis(o-aminophenoxy)ethan-N,N,N',N'-tetraessigsäure
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
BFNC	Benign familial neonatal convulsion
CNQX	6-Cyano-7-nitroquinoxalin-2,3-dion
Ca	Kalzium
CaCl ₂	Kalziumchlorid
CA	Cornu ammonis
CdCl ₂	Cadmiumchlorid
cDNA	Complementary deoxyribonucleic acid
Cs	Cäsium
DAPI	4,6-Diamidin-2-phenylindol
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ENU	N-Ethyl-N-nitrosoharnstoff
ES	Embryonic stem cell
GABA	Gamma-Aminobuttersäure
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein
GM	Gastric mill
GTP	Guanosintriphosphat
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
I _A	A-Typ Kaliumstrom
I _h	Hyperpolarisation-aktivierter Einwärtsstrom

I_M	M-Typ Kaliumstrom
I_{NaP}	Persistierender Natriumstrom
IC	Inferior cardiac
K	Kalium
KCl	Kaliumchlorid
KOH	Kaliumhydroxid
LG	Lateral gastric
LH-RH	Luteinisierendes Hormon Releasing-Hormon
LP	Lateral pyloric
LPG	Lateral posterior gastric
LTD	Long term depression
LTP	Long term potentiation
mEPSC	Miniature excitatory postsynaptic current
$MgCl_2$	Magnesiumchlorid
MHC1	Major histocompatibility complex 1
mRNA	Messenger ribonucleic acid
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
$NaHCO_3$	Natriumhydrogencarbonat
NaH_2PO_4	Natriumdihydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PD	Pyloric dilator
PFA	Paraformaldehyd
RT-PCR	Reverse-transcription polymerase-chain reaction
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
Spike ADP	Spike Afterdepolarization
STG	Stomatogastrisches Ganglion
TNF	Tumornekrosefaktor α
TTX	Tetrodotoxin
XE 991	10,10-bis(4-Pyridinylmethyl)-9(10H)-anthracenon
ZNS	Zentrales Nervensystem

1. Einleitung

1.1 Neuronale Plastizität

Nervenzellen im zentralen Nervensystem (ZNS) sind keine statischen, unveränderlichen Bestandteile neuronaler Netzwerke, sondern können ihre synaptischen Verknüpfungen und ihre zellulären Eigenschaften zu unterschiedlichen Zwecken verändern, was man als Plastizität bezeichnet. Zu plastischen Veränderungen kommt es unter anderem während der Entwicklung von neuronalen Netzwerken und lebenslang bei Lernvorgängen. Zwei Mechanismen, von denen angenommen wird, dass sie diesem Zwecke dienen, und welche gut beschrieben sind, werden als synaptische und intrinsische Plastizität bezeichnet. Synaptische Plastizität meint in diesem Zusammenhang vor allem aktivitätsabhängige Stärkung oder Abschwächung einzelner Synapsen, also *Long term potentiation (LTP)* bzw. *Long term depression (LTD)*, wogegen Veränderungen von passiven Zelleigenschaften oder spannungsaktivierbarer Kanäle als intrinsische Plastizität bezeichnet werden (Malenka, 1994; Katz und Shatz, 1996; Zhang und Linden, 2003; Nelson und Turrigiano, 2008). Diese Veränderungen, welche zum Beispiel zum Einbau neuer AMPA-Rezeptoren in die Zellmembran oder zu Phosphorylierungen von Ionenkanälen führen, können schon innerhalb kürzester Zeit ausgelöst werden und die Erregbarkeit der Zelle und des Netzwerkes entscheidend verändern. Dabei hängt die Erregbarkeit des neuronalen Netzwerkes, also die *Input-Output*-Beziehung, sowohl von der synaptischen Konnektivität als auch von den intrinsischen Eigenschaften der einzelnen Nervenzellen ab.

Zusätzlich müssen Mechanismen existieren, die über einen langen Zeitraum für Stabilität im Feuerverhalten von einzelnen Nervenzellen und in Netzwerken sorgen. Schnellwirksame Mechanismen wie *LTP* oder *LTD* tendieren ansonsten dazu, neuronale Netzwerke zu destabilisieren, so dass ein sinnvoller Informationsaustausch über längere Zeiträume nicht möglich ist. Diese nötige Stabilität wird durch homöostatische Mechanismen erreicht (Turrigiano und Nelson, 2004). Mit diesen homöostatischen Prinzipien ist es neuronalen Netzwerken möglich, trotz plastischer Veränderung lebenslang einen optimalen Informationsaustausch aufrecht zu erhalten (Stemmler und Koch, 1999; Turrigiano, 1999), wobei Moleküle, welche an Signalwegen und Feuerverhalten beteiligt

sind, in Nervenzellen mit kurzen Halbwertszeiten ausgetauscht werden können (Staub et al., 1997; Jugloff et al., 2000; Hanwell et al., 2002).

1.2 Homöostase

Homöostase (aus dem Griechischen: *ομοιος*, *homoios*, „gleich“; und *στασις*, *stasis*, „Stand, Stillstand“), zuerst von Claude Bernard (um 1865) in Zusammenhang mit der Idee eines *Milieu intérieur* beschrieben und später von Walter Bradford Cannon (1926) als Begriff geprägt, ist das Merkmal eines Systems, welches das innere Milieu reguliert und welches danach strebt, stabile, konstante Gegebenheiten zu schaffen und zu erhalten (Cannon, 1926; Holmes, 1963, 1967). Ein homöostatisches System hat einen Sollwert, welcher die Leistung, den *Output*, des Systems festlegt. Ziel eines homöostatischen Systems ist es, Abweichungen vom Sollwert mit Kompensationsmechanismen entgegenzuwirken, so dass der Sollwert des Systems wieder erreicht wird. Diese Kompensation wird über einen Rückkopplungskreis (*Feedback*) realisiert. Ein homöostatisches System benötigt außerdem Präzision, damit der Sollwert nach Störungen wieder präzise erreicht werden kann, und Sensoren, welche Abweichungen vom Sollwert als Differenz zwischen aktuellem *Output* und Sollwert wahrnehmen und dies als Fehlersignal ins System zurückmelden können (Davis, 2006).

In mehreren Studien konnte die Existenz von Homöostase beobachtet werden. In einer frühen Studie wurden Nervenzellen des stomatogastrischen Ganglions des Hummers über längere Zeit in Zellkultur gehalten und waren somit einer von der physiologischen Netzwerkaktivität abweichenden Aktivität ausgesetzt. Nach anfänglich abnormen Feuerverhalten in Zellkultur, zeigte sich nach wenigen Tagen eine Wiederherstellung des physiologischen Feuermusters (Turrigiano et al., 1994). Als Ursache dieser Adaptation konnten die Autoren eine Regulation verschiedener Ionenströme, also Veränderungen in den intrinsischen Eigenschaften der Zellen, nachweisen (Turrigiano et al., 1995). Homöostatische Mechanismen wurden anschließend auch in murinen kortikalen Nervenzellen gefunden. Wiederum in Zellkultur gehaltene kortikale Nervenzellen wurden durch unterschiedliche chronische pharmakologische Blockaden entweder einer niedrigeren oder höheren Netzwerkaktivität ausgesetzt. Die Autoren fanden eine gegensin-

nige Regulation (*Scaling*) der synaptischen Stärke. So kam es bei chronischer pharmakologischer Blockade der Aktivität durch TTX oder CNQX zu einer Vergrößerung der Amplitude der durch AMPA-Rezeptoren vermittelten *mEPSCs*. Umgekehrt kam es bei chronischer Blockade der Inhibition mittels GABA_A-Rezeptor-Blockade zu einer Verminderung der *mEPSC*-Amplitude und zu einer Normalisierung der Feuerrate im Sinne einer homöostatischen Kompensation (Turrigiano et al., 1998). In weiteren Versuchen konnte gezeigt werden, dass die Nervenzellen, welche durch TTX aktivitätsdepriviert waren, zusätzlich ihre intrinsischen Eigenschaften veränderten. Genauer gesagt, regulierten sie depolarisierende Natriumströme hoch und hyperpolarisierende Kaliumströme herunter, um auf diese Weise ihre Erregbarkeit wieder zu erhöhen (Desai et al., 1999). Eine aktuelle Studie konnte nun auch *in vivo* Homöostase von Feuerverhalten zeigen (Hengen et al., 2013).

In den genannten Studien kann das Feuerverhalten der Nervenzellen nach obiger Definition als Sollwert eines homöostatischen Systems betrachtet werden, welcher über unterschiedliche Mechanismen, die sowohl intrinsische als auch synaptische Plastizität umfassen, reguliert wird. Die Feuerrate muss allerdings nicht der einzige Sollwert sein, welcher reguliert wird. Zum Beispiel könnten Ionenströme oder Membranpotenzialschwankungen in postsynaptischen, dendritischen oder somatischen Membranen; Kalziumeinstrom in dendritischen *Spines*, Dendriten oder am Soma; Vesikelakkumulation und -freisetzung an Präsynapsen und schließlich Neurotransmitterkonzentrationen innerhalb oder in der Nähe vom synaptischen Spalt als Aktivitätssollwert dienen, welcher dann homöostatisch reguliert wird (Queenan et al., 2012). Eine Regulation des jeweiligen Aktivitätssollwertes kann also auch in verschiedenen Subkompartimenten der Nervenzelle, wie zum Beispiel den Synapsen, Dendriten oder dem Axoninitialsegment, stattfinden (Turrigiano, 2008; Yu und Goda, 2009; Grubb und Burrone, 2010; Kuba et al., 2010).

Welche Sensoren in diesen homöostatischen Systemen existieren und über welche Art von Mechanismen die Rückkopplung funktioniert, die letztlich zur Einstellung des korrekten Sollwertes führt, ist allerdings erst ansatzweise bekannt. Es wird diskutiert, dass Kalzium-abhängige Mechanismen als Aktivitätssensoren dienen könnten (Turrigiano et al., 1994; Ibata et al., 2008; Goold und Nicoll, 2010). Speziell an der Regulation des

Synaptic scaling konnten eine Vielzahl von Molekülen, wie z.B. der *Brain-derived neurotrophic factor* (BDNF), das *Immediate-early* Gen *Arc*, das Zytokin TNF α , das Immunmolekül *MHC1*, das Integrin Beta3 und die *Polo-like* Kinase 2 als mitbeteiligt beschrieben werden (Rutherford et al., 1998; Shepherd et al., 2006; Stellwagen und Malenka, 2006; Goddard et al., 2007; Seeburg et al., 2008; Cingolani et al., 2008; Steinmetz und Turrigiano, 2010). Diese Moleküle werden zum Teil von Gliazellen wie Astrozyten sezerniert (Turrigiano, 2006; Stellwagen und Malenka, 2006). Die Untersuchung der Mechanismen von Homöostase ist also ein komplexes Unterfangen, und im Folgenden sollen daher Ionenströme und ihre vermutete homöostatische Regulation im Mittelpunkt stehen.

Bezüglich der Frage, wie Ionenströme in Nervenzellen homöostatisch reguliert werden, um ein stabiles Feuermuster zu erreichen, konnte überraschenderweise gezeigt werden, dass hierzu nicht eine festgesetzte Größe oder ein festgesetztes Verhältnis verschiedener Ströme nötig ist. Es ist vielmehr möglich, dass ganz unterschiedliche Zusammensetzungen von Ionenströmen zum Erreichen eines korrekten Feuerverhalten führen. Diese Variabilität konnte sowohl in mehreren experimentellen Studien als auch in theoretischen Computersimulationen gezeigt werden (Marder und Goaillard, 2006; Prinz, 2007; Goaillard et al., 2009; Marder, 2011). Der Verlust oder die Überexpression eines einzelnen Ionenkanal-Gens hat in verschiedenen Modellen eine kompensatorische Veränderung von Ionenkanälen zur Folge, was oft zur Wiederherstellung des ursprünglichen Feuermusters führt (MacLean et al., 2003; Swensen und Bean, 2005; Wart und Matthews, 2006; Chen et al., 2006; Muraro et al., 2008; Nerbonne et al., 2008). In diesem Zusammenhang wurde auch gefunden, dass trotz Variabilität Ko-Regulationen von Ionenströmen existieren. MacLean et al. (2003) konnten zeigen, dass eine Überexpression eines Kaliumstroms (I_A) durch *shal-RNA*-Injektion in Neuronen im stomatogastrischen Ganglion des Hummers durch eine Hochregulation eines durch Hyperpolarisation-aktivierbaren Einwärtsstroms (I_h) kompensiert wurde und somit das Feuerverhalten unverändert blieb. Interessanterweise funktionierte diese Kompensation aktivitätsunabhängig, da eine Überexpression einer nicht funktionellen *shal*-Mutante ebenfalls zu einer Hochregulation des I_h und zu verändertem Feuerverhalten führte (MacLean et al., 2003; MacLean et al., 2005). Ebenso wurde in einer Studie in *Drosophila*-Motorneuronen gezeigt, dass die Expression der Gene von *shal* und *shaker* – beide für den I_A -

Strom verantwortlich – reziprok gekoppelt ist (Bergquist et al., 2010). Dass Korrelationen zwischen Ionenströmen bestehen, konnte auch in weiteren Studien gezeigt werden (Schulz et al., 2007; Tobin et al., 2009; O'Leary et al., 2013).

1.3 Feuerverhalten von hippokampalen CA1-Pyramidenzellen

Pyramidenzellen in der CA1-Region des Hippokampus haben eine charakteristische Aktionspotenzialform. Hier folgt auf den durch eine kurze Depolarisierung ausgelösten initialen Aufstrich mit schneller Repolarisation eine mehrere Millisekunden anhaltende Nachdepolarisation, auch *Spike Afterdepolarization (Spike ADP)* genannt. Die korrekte Größe dieser Aktionspotenzialnachdepolarisation ist von Bedeutung, da bei Vergrößerung der Schwellenwert für ein weiteres Aktionspotenzial erreicht werden kann. Die Zelle feuert dann auf eine kurze Strominjektion oder als Antwort auf eine synaptische Erregung nicht ein einzelnes, sondern mehrere Aktionspotenziale. Dieses Feuerverhalten kann zum Beispiel in pathologischen Zuständen wie Epilepsie beobachtet werden, wo regulär feuernde Nervenzellen in einen *Bursting*-Modus konvertieren und neben anderen Faktoren für eine erhöhte Netzwerkaktivität sorgen (Beck und Yaari, 2008). Welchen Einfluss *Regular firing*- und *Bursting*-Nervenzellen auf neuronale Netzwerke haben, wurde auch von Kepecs und Lisman (2003) untersucht. Mehrere Studien haben die Ionenströme untersucht, welche diese Nachdepolarisation kontrollieren. Es zeigte sich, dass eine akute pharmakologische Blockade des persistierenden Natriumstroms durch Riluzol zu einer Verminderung des *Spike ADP* führt. Eine Blockade des M-Typ Kaliumstroms durch XE 991 vergrößert hingegen die Nachdepolarisation und löst regelmäßig einen Wechsel vom regulären in das *Bursting*-Feuerverhalten aus. Die Lokalisation der beiden Ströme wurde in diesen Studien als perisomatisch beschrieben (Yue und Yaari, 2004; Yue et al., 2005; Yue und Yaari, 2006; Golomb et al., 2006). Abweichend hiervon zeigten verschiedene Studien, dass auch Kalzium- und weitere Kaliumströme an der Entstehung des *Spike ADP* beteiligt sind und diese Ströme zum Teil in den Dendriten lokalisiert sind. Gründe für diese gegensätzlichen Ergebnisse könnten sowohl in der unterschiedlichen Methodik als auch im Alter der untersuchten Versuchstiere liegen (Magee und Carruth, 1999; Jung et al., 2001; Metz et al., 2005; Chen et al., 2005; Metz et al., 2007). Unabhängig von dieser widersprüchlichen Studienlage scheint

der persistierende Natrium- und der M-Typ Kaliumstrom zumindest aber von entscheidender Bedeutung bei der Regulation des *Spike ADP* zu sein.

1.4 Der persistierende Natriumstrom (I_{NaP})

Der persistierende Natriumstrom ist ein langsam inaktivierender Ionenstrom, welcher durch Natriumkanäle mit einer Aktivierung nahe des Ruhemembranpotenzials, an dem transiente Natriumströme noch weitgehend geschlossen sind, vermittelt wird. Er wurde in zentralen und peripheren Neuronen in verschiedenen Regionen, wie zum Beispiel dem Neokortex, entorhinalen Kortex, Thalamus, Kleinhirn, Hippokampus und in Spinalganglien, beschrieben (French et al., 1990; Crill, 1996; Baker und Bostock, 1997). Eine wichtige Rolle spielt er bei der Aktionspotenzialinitiierung, bei niederschwelligen (*subthreshold*) Oszillationen des Membranpotenzials und er erhält repetitives Feuern als Antwort auf langanhaltende Membrandepolarisationen aufrecht (Alonso und Llinás, 1989; Amitai, 1994; Raman et al., 1997; Agrawal et al., 2001; Wart und Matthews, 2006; Royeck et al., 2008). Des Weiteren verstärkt der persistierende Natriumstrom synaptische Potenziale und wirkt an intrinsischen Schrittmacheraktivitäten von verschiedenen Neuronen mit (Schwindt und Crill, 1995; Do und Bean, 2003; Tazerart et al., 2008; Huang und Trussell, 2008). Mehrere Studien konnten zeigen, dass pathologische Zustände der Übererregbarkeit, wie chronische Epilepsie, Hypoxie und intrazerebrale Blutungen, mit einer Vergrößerung des I_{NaP} einhergehen, was eine Rolle dieses Stroms in pathologischer Synchronisierung nahelegt (Horn und Waldrop, 2000; Vreugdenhil et al., 2004; Chen et al., 2011; Isaeva et al., 2012). Wie genau und durch welche Natriumkanaluntereinheiten der persistierende Natriumstrom zustande kommt, ist nicht bekannt. Vorgeschlagen wurde, erstens, die *Window current*-Hypothese, zweitens, die Möglichkeit seiner Generierung durch verschiedenartige nicht-inaktivierende Kanaluntereinheiten, und drittens, die *Modal gating*-Hypothese (Crill, 1996). Signifikante Reduktionen im persistierenden Natriumstrom in hippocampalen CA1-Pyramidenzellen werden bei Verlust der Natriumkanaluntereinheit $Na_v1.6$, welche durch das Gen *Scn8a* kodiert wird, gesehen (Royeck et al., 2008). Des Weiteren ist aus Untersuchungen in verschiedenen Expressionssystemen und in akuten Hirnschnittpräparationen bekannt, dass Natriumströme durch Proteinkinase A und C, GTP-bindende Proteine, die akzessorischen

Kanaluntereinheiten $\beta 1$ bis $\beta 4$ und Ankyrin G in ihrer Aktivierung und Inaktivierung beeinflusst werden können (Dascal und Lotan, 1991; Numann et al., 1991; Li et al., 1992; Ma et al., 1994; Ma et al., 1997; Qu et al., 2001; Chen et al., 2006a; Shirahata et al., 2006; Aman et al., 2009; Bant und Raman, 2010). Die $\text{Na}_v1.6$ -Untereinheiten, welche in hippokampalen Neuronen einen großen Teil am persistierenden Natriumstrom ausmachen, werden über ein Ankyrin G-Bindungsmotiv in der intrazellulären Schleife (L2) zwischen Segment 2 und 3 des Natriumkanals zum Axoninitialsegment (AIS) und zu den Ranvierschen Schnürringen lokalisiert (Zhou et al., 1998; Garrido et al., 2003; Gasser et al., 2012). Dort bestimmen sie unter anderem den Schwellenwert für die Initiierung eines Aktionspotenzials und dessen weitere Propagation (Royeck et al., 2008).

1.5 Der M-Typ Kaliumstrom (I_M)

Der M-Typ Kaliumstrom, so genannt, weil seine Aktivität durch muskarinerge Azetylcholin-Rezeptor-Agonisten inhibiert werden kann, wurde ursprünglich in sympathischen Neuronen beschrieben (Brown und Adams, 1980). Ebenso wie der I_{NaP} ist er schon bei niederschwelligen Membranspannungen aktivierbar. Da er nicht inaktiviert, klemmt er so das Membranpotenzial bei exzitatorischen Stimuli und drosselt repetitives Feuerverhalten in verschiedenen zentralen und peripheren Neuronen (Delmas und Brown, 2005). M-Typ Kaliumströme im ZNS entstehen durch Zusammenfügen von Heteromeren verschiedener K_v7 -Untereinheiten ($\text{K}_v7.2$, $\text{K}_v7.3$ und $\text{K}_v7.5$) (Wang et al., 1998; Schroeder et al., 2000), wobei $\text{K}_v7.2/\text{K}_v7.3$ -Heteromere die größten Kaliumströme generieren (Schroeder et al., 1998). Sie werden durch die Gene *Kcnq2*, *Kcnq3* und *Kcnq5* kodiert. Es sind Mutationen in diesen Genen bekannt, die Epilepsieformen wie die autosomal-dominante *Benign familial neonatal convulsion* (BFNC) verursachen (Jentsch, 2000). Im Mausmodell führt eine M-Typ Kaliumstrom-Reduktion durch Expression einer dominant-negativen $\text{K}_v7.2$ -Untereinheit zu spontanen epileptischen Anfällen, Verhaltensauffälligkeiten und morphologischen Veränderungen im Hippokampus. Es zeigt sich eine erhöhte neuronale Erregbarkeit mit Verminderung der *Spike frequency adaptation*, der *Medium afterhyperpolarization* und der intrinsischen niederschwelligen Thetaresonanz (Peters et al., 2005). Eine Vielzahl von verschiedenen Molekülen, welche den M-Typ Kaliumstrom modifizieren können, ist bekannt. Dazu gehören

Neurotransmitter wie Azetylcholin und Cannabinoide, Peptide, wie das luteinisierende Hormon Releasing-Hormon (LH-RH), Angiotensin, Substanz P oder Bradykinin, intrazelluläre *Messenger*, wie Kalzium, Diazylglyzerol, zyklischem AMP, Phospholipase C oder die Src-Tyrosin-Kinase und schließlich auch Bikarbonate (Schroeder et al., 1998; Schweitzer, 2000; Delmas und Brown, 2005; Suh und Hille, 2008; Jones et al., 2014). Des Weiteren inhibiert Hypoosmolalität M-Typ Kaliumströme (Caspi et al., 2009). Wie die $\text{Na}_v1.6$ -Untereinheiten befinden sich $\text{K}_v7.2$ - und $\text{K}_v7.3$ -Untereinheiten am Axoninitialsegment und an Ranvierschen Schnürringen (Devaux et al., 2004). Über ein C-terminales Bindungsmotiv werden auch sie an Ankyrin G und somit an das Zytoskelett gebunden. Dieses C-terminale Bindungsmotiv ist dem der $\text{Na}_v1.6$ -Untereinheit entwicklungsgeschichtlich analog (Pan et al., 2006; Rasmussen et al., 2007). Hinsichtlich der Frage, ob funktionelle M-Typ Kaliumströme in Dendriten gefunden werden können, existieren widersprüchliche Studien (Yue und Yaari, 2006; Hu et al., 2007).

1.6 Fragestellung der vorliegenden Arbeit

Aufgrund der Bedeutung des persistierenden Natrium- und des M-Typ Kaliumstroms für das Feuerverhalten und speziell für die Aktionspotenzialnachdepolarisation von hippocampalen CA1-Pyramidenzellen, sollte die Größe beider Ströme homöostatisch kontrolliert werden. Da beide Ströme die Erregbarkeit der Nervenzelle in gegensätzlicher Richtung beeinflussen und zusätzlich die zugrundeliegenden Kanaluntereinheiten am Axoninitialsegment ko-lokalisiert sind, könnte die Homöostase im Sinne einer Ko-Regulation bewerkstelligt werden. Dies scheint umso wahrscheinlicher, da die Aktionspotenzialnachdepolarisation, welche von beiden Strömen hauptsächlich geprägt wird, in CA1-Pyramidenzellen bemerkenswert konstant ist. Falls diese Ionenströme ko-reguliert werden, sollte eine Vergrößerung oder Reduktion einer dieser Ströme zu einer gleichsinnigen Änderung des jeweiligen anderen führen. Diese Frage wurde mit Hilfe elektrophysiologischer und molekularbiologischer Methoden untersucht. Es wurden genetisch veränderte Mausmodelle benutzt, welche durch unterschiedliche Verfahrensweisen chronisch reduzierte persistierende Natrium- bzw. M-Typ Kaliumströme besitzen. Um die Auswirkung dieser chronischen Veränderungen auf den nicht modifizierten Strom zu untersuchen, wurden beide Ströme mittels der *Whole-cell voltage-clamp*-Methode

sequenziell in derselben Zelle gemessen. Es wurden außerdem in einigen Modellen die *mRNA*-Expressionslevel verschiedener Kanaluntereinheiten verglichen und das Feuerverhalten gemessen.

2. Material und Methoden

2.1 Mausmodelle

Alle Tierexperimente wurden in Übereinstimmung mit den Richtlinien der Tierschutzbestimmung der Universität Bonn durchgeführt. Die Mäuse wurden in Standardmauskäfigen unter konventionellen Laborbedingungen (12h/12h Tag-Nacht Rhythmus, konstante Temperatur und Luftfeuchtigkeit, und Nahrung und Wasser *ad libitum*) gehalten.

C57Bl/6-Mäuse

Adulte männliche Mäuse vom C57Bl/6-Stamm wurden von Charles River (Erkrath) bezogen und den Experimenten im Alter von 8-10 Wochen zugeführt.

***Scn8a*^{med}-Modell**

Die Experimente wurden an Mäusen durchgeführt, welche homozygot für die 1958 spontan entstandene autosomal-rezessive *muscular endplate disease* (*med*)-Mutation waren. Diese Mutation entstand durch Insertion eines trunkierten LINE-Elements in das Exon 2 des *Scn8a*-Gens auf Chromosom 15, wodurch es zu alternativem *Splicing* und einer Verschiebung des Leserasters mit vorzeitigem Stoppcodon in der Nähe des N-Terminus des Proteins kam (Kohrman et al., 1996). Dies führte zu einem trunkierten nicht funktionsfähigen Na_v1.6-Kanal, der die Zellmembran nicht erreicht (Burgess et al., 1995). Phänotypisch entwickeln Mäuse, die homozygot für die *motor endplate disease* (*med*)-Mutation sind, um den 10. postnatalen Tag eine progressive Muskelschwäche mit Ataxie, die in eine proximale Paralyse vor allem der Hinterbeine übergeht und innerhalb von 3-4 Wochen letal ist. Der Grund für die Paralyse wird in einer funktionellen Denervation durch Verlust der Natriumkanalexpression in spinalen Motoneuronen mit sukzessivem Scheitern der neuromuskulären Transmission gesehen (Duchen, 1970; Duchen und Stefani, 1971). Heterozygote *Scn8a*^{med/wt}-Zuchteltern (C3HeB/FeJ-*Scn8amed/J*; Stock No. 003798) wurden von The Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine, USA) bezogen. Männliche und weibliche Tiere wurden im Alter von 18-21 Tagen für die Experimente verwendet. Die Tiere in der Mutanten-Gruppe (*Scn8a*^{med}) trugen homozygot die *med*-Mutation. Als Kontrollgruppe (*Scn8a*^{wt}) dienten Wurfgeschwister,

welche homozygot für das Wildtyp-Allel waren. Die Genotypisierung erfolgte mittels *PCR*.

PM2/1-Modell

Die Herstellung der *PM2/1*-Mauslinie (korrekte Bezeichnung: *B6FVBF1/J-Tg(PrnP-tTA, tetO-KCNQ2-G279S)2lsb*) erfolgte wie bei Peters et al. (2005) beschrieben. Als einziger Unterschied erfolgte die Insertion des porenmutierte *hKCNQ2*-Konstrukts (*hQ2-G279S*), welches dominant-negative Eigenschaften besitzt, an einem autosomalen Locus. Es wurden doppelt-transgene Mäuse generiert, welche einen *Tetracycline-sensitive trans-activator* (*tTA*; *Tet-Off*-System) unter der Kontrolle des Prion-Protein-Promoters (*Prnp*), und das porenmutierte *hKCNQ2*-Konstrukt fusioniert an ein *Tetracycline-responsive element* (*TRE*) exprimierten. Männliche und weibliche Tiere wurden im Alter von 8-11 Wochen für die Experimente verwendet. Die Tiere in der Transgen-Gruppe (*PM2/1^{tg}*) waren doppelt-transgen für das *Tet-Off*-System und das *TRE-hQ2-G279S*-Konstrukt. Als Kontrollgruppe (*PM2/1^{ct}*) dienten Wurfgeschwister, welche entweder nur für das *Tet-Off*-System oder nur für das *TRE-hQ2-G279S*-Konstrukt transgen waren. Die Genotypisierung erfolgte mittels *PCR*. Schwangere Weibchen erhielten über das Trinkwasser (*ad libitum*) Doxzyklin (200 µg/ml, Sigma, Steinheim). Ab dem ersten postnatalen Tag wurden die stillenden Weibchen mit Trinkwasser ohne Doxzyklin versorgt, um eine ausreichende M-Typ Kaliumstromverminderung im *PM2/1^{tg}*-Nachwuchs zu erreichen.

Kcnq2^{flox}-Modell

Die *Kcnq2^{flox}*-Mäuse wurden folgendermaßen hergestellt. Ein ES-Zellklon, welcher eine *Knockout first*-Kassette (*reporter-tagged insertion with conditional potential*) im *Kcnq2*-Gen enthielt, wurde über das *International Knock-out Mouse Consortium* (IKMC; ES cell clone: EPD0227_5_D10, parental ES cell line: JM8.N4) bezogen. Nach Vervielfältigung des ES-Zellklons wurde er in *C57Bl/6J*-Mausblastozysten mikroinjiziert und anschließend in pseudoschwangere *CBA/C57Bl/6J*-Weibchen transferiert. Mäuse, welche das *Knockout first*-Allel (*Kcnq2^{tm1a(EUCOMM)Wtsi}*) enthielten, wurden über eine *PCR*-Genotypisierung identifiziert und mit einer *Flp deleter*-Mauslinie gekreuzt, um die inserierte Reporterkassette zu entfernen und so „gefloxe“ *Kcnq2^{tm1c(EUCOMM)Wtsi}* (*Kcnq2^{fl/fl}*)-Allele zu erhalten. Eine Vorderhirnspezifität der *Kcnq2-Knockout*-Mäuse wurde über eine Ver-

paarung mit *CaMKIIa-cre*-Mäusen (Casanova et al., 2001) erreicht (Stock No. 005359; The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, USA). Männliche und weibliche Tiere wurden im Alter von 7-8 Wochen für die Experimente verwendet. Die Tiere in der Transgen-Gruppe (*Kcnq2^{flox}*) waren homozygot defizient für das *Kcnq2*-Gen. Als Kontrollgruppe (*Kcnq2^{ct}*) dienten Wurfgeschwister, die entweder nur das *CamKIIa-cre*- oder nur das *Kcnq2^{tm1c(EUCOMM)Wtsi}*-Allel trugen. Die Genotypisierung erfolgte mittels *PCR*.

***NMF134^{mut}*-Modell**

C57BL/6J-Kcnq2Nmf134/J-Mäuse (Stock No. 004703) wurden über The Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine, USA) bezogen. Diese Mäuse wurden durch chemische Mutagenese mittels N-ethyl-N-nitrosoharnstoff (ENU) hergestellt (Kearney et al., 2006). Dies induzierte eine Punktmutation mit dem Aminosäureaustausch von Valin 182 durch Methionin. Homozygote *Kcnq2V182M/V182M*-Mäuse zeigen spontane Krampfanfälle, die zu einer verfrühten Letalität führen. Männliche und weibliche Tiere wurden im Alter von 15-16 Tage für die Experimente verwendet. Die Tiere in der Mutanten-Gruppe (*NMF134^{mut}*) trugen homozygot die ENU-Mutation. Als Kontrollgruppe (*NMF134^{ct}*) dienten Wurfgeschwister, welche homozygot für das Wildtypallel waren. Die Genotypisierung erfolgte mittels *PCR*.

***Scn1b-null*-Modell**

Die Herstellung der *Scn1b-null*-Mäuse, welche defizient für das *Scn1b*-Gen sind, wurde von Chen et al. (2004) beschrieben. Die Mäuse, welche in der vorliegenden Studie benutzt wurden, wurden von kongenen *Scn1b^{+/-}*-Mäusen der 10. Generation oder höher auf genetischen *C57Bl/6*-Hintergrund gezüchtet. Es sei betont, dass die *Scn1b-null*-Tiere sowohl für die akzessorische Kanaluntereinheit $\beta 1$ als auch für die Splicevariante $\beta 1A$ defizient sind (Kazen-Gillespie et al., 2000). Männliche und weibliche Tiere wurden im Alter von 15-19 Tagen bzw. im Alter von 8-12 Wochen für die Experimente verwendet. In der juvenilen Untersuchungsgruppe waren die Tiere in der *Scn1b-null*-Gruppe homozygot defizient für das *Scn1b*-Gen. In der adulten Untersuchungsgruppe waren die Tiere in der *Scn1b^{+/-}*-Gruppe heterozygot defizient für das *Scn1b*-Gen. Als Kontrollgruppe dienten jeweils gleichaltrige Wurfgeschwister, welche homozygot für das Wildtypallel waren. Die Genotypisierung erfolgte mittels *PCR*.

Q2-ABP-Modell (C2A-rQA-A)

Die Q2-ABP-Mäuse wurden folgendermaßen hergestellt. Das Ankyrin G-Bindungsmotivpeptid (YIAEGESDTD) von KCNQ2 (Chung et al., 2006; Shah, 2008) wurde mittels DNA-Synthese an den C-Terminus des humanisierten Renilla-Green Fluorescent Protein (*hrGFP*, Stratagene, CA, USA) fusioniert (*hrGFP-Q2ABP*). Zur Herstellung transgener Mäuse wurde das *Tet-responsive element* (*Tre-Tight*) von pTRE-Tight (Clontech, Mountain View, CA, USA) in pWHERE2 v.01 (Invivogen, San Diego, CA, USA) kloniert. *hrGFP-Q2ABP* wurde abwärts von *Tre-Tight* inseriert. Die kodierenden Sequenzen wurden über direktes Sequenzieren verifiziert. Über eine Pronukleus-Injektion des aufgereinigten Plasmids mittels Standardtechniken wurden transgene Mäuse generiert, welche ein *pWHERE hrGFP-Q2ABP* (*C57BL/6J-Tg(tetO-hrGFP-Q2ABP)Alsb*)-Konstrukt trugen. Zuchtmäuse und der resultierende Nachwuchs wurden mittels *PCR* genotypisiert und mit einer transgenen Mauslinie, welche einen Gehirn-spezifischen Promoter (*C57BL/6J-Tg(Camk2a-tTA)1Mmay/J*) (Mayford et al., 1996) exprimiert und über The Jackson Laboratories (Bar Harbor, MA, USA) bezogen wurden, gekreuzt. Anschließend wurden diese Tiere auf einem *C57BL/6J*-Hintergrund für mehr als 10 Generationen zurückgekreuzt. Männliche und weibliche Tiere wurden im Alter von 7 Wochen für die Experimente verwendet. Die Tiere in der *Q2ABP^{tg}*-Gruppe exprimierten unter der Kontrolle des *CaMKIIa*-Promoter das *hrGFP-Q2ABP*-Konstrukt im Subiculum. Die GFP-positiven Zellen wurden über Epifluoreszenz sichtbar gemacht. Als Kontrollgruppe (*Q2ABP^{ct}*) dienten Wurfgeschwister, welche entweder nur das *hrGFP-Q2ABP*-Konstrukt oder nur das *CaMKIIa-tTA*-Konstrukt trugen. Die Genotypisierung erfolgte mittels *PCR*.

2.2 Präparation von Hirngewebe für elektrophysiologische Messungen

Zur Anästhesie der Mäuse wurden Ketamin 10 % (100 mg/kg, WDT, Garbsen) und Rompun 2 % (15 mg/kg, Bayer, Leverkusen) als intraperitoneale Injektion verabreicht. Nachdem Schmerzreflexe nicht weiter auslösbar waren, wurden die Tiere dekapitiert, das Gehirn zügig freipräpariert und in eine mit Carbogen begaste (95 % O₂, 5 % CO₂; Linde, Bonn) 1-4 °C kalte Sucrose-basierte artifizielle zerebrospinale Flüssigkeit gelegt (ACSF I). Die ACSF I enthielt (in mM): 56 NaCl, 100 Sucrose, 2,5 KCl, 1,25 NaH₂PO₄,

30 NaHCO₃, 1 CaCl₂, 5 MgCl₂ und 20 Glukose (Sigma, Steinheim). Die Osmolalität betrug etwa 305 mOsm, gemessen mit einem Vapro Osmometer 5520 (Wescor, Pfullingen).

Das Gehirn wurde dann mit einem Vibratom (HM 650V, Thermo Scientific, Schwerte) in 300 µm dicke horizontale hippokampale Hirnschnitte geschnitten. Zu diesem Zwecke wurde das Gehirn, mit der ventralen Kortexoberfläche oben, mit Sekundenkleber (Pattex, Henkel, Düsseldorf) auf die Vibratomobjektplatte geklebt und mit ACSF I vorsichtig übergossen. Nach dem Schneidevorgang wurden die Hirnschnitte auf Netze in einer Aufbewahrungskammer umgesetzt, welche eine mit Carbogen begaste etwa 20 °C warme Sucrose-basierte ACSF II enthielt. Diese ACSF II enthielt (in mM): 60 NaCl, 100 Sucrose, 2,5 KCl, 1,25 NaH₂PO₄, 26 NaHCO₃, 1 CaCl₂, 5 MgCl₂ und 20 Glukose (Osmolalität ~305 mOsm). Die Kammer wurde dann allmählich in einem Wasserbad (Sonorex Super RK 102 H, Bandelin, Berlin) auf 35 °C erwärmt und dort für 25 Minuten belassen. Schließlich wurden die Hirnschnitte auf Netze in einer neuen Aufbewahrungskammer umgesetzt, welche eine weitere mit Carbogen begaste ACSF-Lösung (ACSF III) enthielt. ACSF III (in mM): 125 NaCl, 3,5 KCl, 1,25 NaH₂PO₄, 26 NaHCO₃, 2 CaCl₂, 2 MgCl₂ und 15 Glukose (Osmolalität ~307 mOsm). Dort wurden die Hirnschnitte für mindestens 30 Minuten belassen, bevor sie für elektrophysiologische Untersuchungen verwendet wurden.

2.3 Whole-cell current-clamp-Messungen

Im Rahmen der elektrophysiologischen Messungen wurden die Hirnschnitte in eine kontinuierlich mit ACSF III (equilibriert mit Carbogen) gespülte Kammer transferiert. Diese Kammer war auf einem Objektisch eines aufrechten Mikroskops (Axioskop 2 FS, Zeiss, Göttingen) angebracht. Alle Experimente wurden mit Hilfe einer Temperaturkontrolle (Temperatur controller III, Luigs und Neumann, Ratingen) in einer Badlösung von 35 °C durchgeführt. Die Nervenzellen wurden mit einer schrägen Infrarot-Belichtungs-optik (TILL Photonics, Gräfeling), einem Wasserimmersionsobjektiv (Olympus 60x/NA 0.9, Tokyo, Japan) und einer TILL-IMAGO Kamera (TILL Photonics, Gräfeling) sichtbar gemacht.

Somatische *Whole-cell current-clamp*-Messungen wurden mit einem BVC-700A Verstärker (Dagan Corporation, Minneapolis, MN, USA) durchgeführt. Die *Whole-cell*-Konfiguration wurde im *Voltage-clamp*-Modus erhalten, anschließend wurde im *Current-clamp*-Modus die Pipettenkapazität und die Brückenbalance kontrolliert und kompensiert. Der Serienwiderstand der *Current-clamp*-Messungen reichte von 10 bis 30 MΩ. Zellen mit einem Membranpotenzial positiver als -60 mV wurden ausgeschlossen. Die Daten wurden mit 10 kHz tiefpassgefiltert und mit 100 kHz mit einem Digidata 1440 Interface, kontrolliert von einer pClamp Software (Molecular Devices, CA, USA), aufgenommen. Die Patch-Pipetten mit einem Widerstand von 3 bis 4 MΩ wurden aus Borosilikatglas-Kapillaren (GB 150F 8P, Science Products, Hofheim) mit Hilfe eines Pipettenziehers (P-97, Sutter Instrument Co., CA, USA) hergestellt.

Innen- und Badlösung der *Current-clamp*-Messungen

Die Innenlösung für die *Current-clamp*-Messungen enthielt (in mM): 130 K-Gluconat, 20 KCl, 10 HEPES(*acid*), 0,16 EGTA, 2 MgATP, 2 Na₂ATP. Der pH von 7,25 wurde mit KOH und die Osmolalität von ~295 mOsm mit Sucrose eingestellt. Als Badlösung wurde ACSF III verwendet. Das kalkulierte Übergangspotenzial für diese Lösungen betrug +15 mV und alle Werte und Abbildungen wurden dementsprechend korrigiert.

Analyse der *Current-clamp*-Messungen

Aktionspotenziale wurden quantitativ beschrieben, indem ihre maximale Amplitude, die maximale Steigungs- und Abfallrate, der Aktionspotenzialschwellenwert und die Aktionspotenzialnachdepolarisation ausgelöst durch eine 3 ms lange Strominjektion bestimmt wurden. Die Amplitude wurde als Differenz zwischen dem Ruhemembranpotenzial und der Spitze des Aktionspotenzials definiert. Die maximale Rate von Steigung und Abfall des Aktionspotenzials wurden als der Hoch- und Tiefpunkt der zweiten Ableitung der Spannungsspur bestimmt. Der Aktionspotenzialschwellenwert wurde festgesetzt als der Punkt der Spannung, an dem die Steigung der Spannungsspur 15 mV/ms überschritt (Sekerli et al., 2004). Die Fläche der Aktionspotenzialnachdepolarisation (*Spike ADP*) wurde unter dem *Spike ADP*, beginnend von der schnellen Nachhyperpolarisation bis zur Rückkehr der Spannung zum Haltepotenzial, gemessen. Da dies Werte hervorbringt, welche die aktive und passive Komponente des *Spike ADP* umfassen, wurde zusätzlich

die Fläche eines „aktiven“ *Spike ADP* bestimmt. Hierzu wurde die Differenz aus der Fläche der Aktionspotenzialnachdepolarisation und der Spannungsantwort, die durch eine gerade noch niederschwellige Strominjektion ausgelöst wurde, gebildet (Royeck et al., 2008). Die Amplitude des *Spike ADP* wurde als Amplitude vom Haltepotenzial bis zum Hochpunkt des *Spike ADP* definiert. Bei der Berechnung der Amplitude des „aktiven“ *Spike ADP* wurde von diesem Wert die passive Spannungsantwort zum selben Zeitpunkt subtrahiert. Zusätzlich wurden in Messungen mit langen Strominjektionen (500 ms) die Adaptation der Aktionspotenzialfrequenz und die Aktionspotenzialzunahme (*Gain*) bestimmt. Zur Bestimmung der Adaptation wurde der Quotient vom *Interspike*-Intervall (in ms) zwischen dem 9. und 10. Aktionspotenzial und dem *Interspike*-Intervall zwischen dem 2. und 3. Aktionspotenzial gebildet.

2.4 Whole-cell voltage-clamp-Messungen

Die Aufnahmen wurden mit Hilfe eines Axopatch 200B-Verstärkers (Molecular Devices, CA, USA) durchgeführt. Der Serienwiderstand betrug 6-10 M Ω und wurde über den Kompensationsschaltkreis des Verstärkers zu 90-95 % kompensiert. Die Stromantworten des persistierenden Natriumstroms wurden mit einem Tiefpassfilter von 1 kHz, die des M-Typ Kaliumstrom mit 5 kHz gefiltert, und mit einem Digidata 1440 Interface, kontrolliert von einer pClamp 9.0 Software (Molecular Devices, CA, USA), aufgenommen. Die Experimente wurden mit einer Badtemperatur von 35 °C durchgeführt.

Abweichend hiervon wurden im *NMF134^{mut}*-Modell die *Whole-cell voltage-clamp*-Messungen mit 2,9 kHz gefiltert und mit 10 kHz mittels eines EPC10 Verstärkers und der PULSE Software (HEKA, Ludwigshafen) aufgenommen.

Innen- und Badlösung der *Voltage-clamp*-Messungen

Die Innenlösung für die *Voltage-clamp*-Messungen enthielt (in mM): 130 K-Gluconat, 20 KCl, 10 HEPES-Na, 2 BAPTA (Tocris Bioscience, Wiesbaden-Nordenstadt), 2 MgATP, 2 Na₂ATP. Der pH von 7,25 wurde mit KOH und die Osmolalität von ~295 mOsm mit Sucrose eingestellt. Die Badlösung enthielt (mM): 140 NaCl, 3 KCl, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 20 Glucose, 10 HEPES(*acid*), 2 4-AP (Acros Organics, Schwerte), 0,2 CdCl₂ (Fluka

Chemika, Steinheim). Der pH von 7,4 wurde mit Hilfe von NaOH (Merck, Darmstadt) und eines pH-Meters (pH-Meter 766 calimatic, Knick, Berlin) eingestellt. Die Osmolalität betrug etwa 305 mOsm. Das kalkulierte Übergangspotenzial für diese Lösungen betrug +12,5 mV, und alle Werte und Abbildungen wurden dementsprechend korrigiert.

Bestimmung der passiven Zelleigenschaften

Zu Beginn der *Whole-cell voltage-clamp*-Messung wurde zuerst eine Stromantwort durch 200 ms lange Spannungssprünge von -80 mV alternierend auf -85 mV bzw. -90 mV ausgelöst, um die passiven Eigenschaften der Zelle (Eingangswiderstand und Zellkapazität) zu erhalten. Der Eingangswiderstand wurde mit Hilfe des Ohmschen Gesetzes als der Quotient aus dem jeweiligen Spannungssprung und der Stromantwort berechnet. Die Zellkapazität wurde durch die Quantifizierung der Ladung (Q_c), welche benötigt wurde, die Membran vollständig zu laden, bestimmt. Q_c wurde gemessen als die Fläche unter der Stromantwort, welche durch die genannten Spannungssprünge ausgelöst wurde, und von der Ladung, welche über den Membranwiderstand floss, subtrahiert. Die Zellkapazität wurde dann als Q_c/V kalkuliert, wobei V die Größe des Spannungssprungs ist.

Sequenzielle Messung von I_{NaP} und I_M in derselben Zelle

Es wurde eine langsame Spannungsrampe von -90 mV auf -20 mV (50 mV/s) verwendet, welche die schnellen transienten Einwärtsströme inaktivierte, um einen langsamen Einwärtsstrom aufzunehmen. Anschließend wurde die gleiche Messung nach einem schnellen Einwasch von 1 μ M TTX (Tocris Bioscience, Bristol, UK) durchgeführt. Die Differenz beider gemessener Stromantworten entsprach dann dem pharmakologisch isolierten I_{NaP} .

Mit TTX in der Badlösung wurde die Zelle bei -60 mV gehalten und der M-Typ Kaliumstrom wurde als *Tail*-Strom nach Spannungssprüngen von einem Haltepotenzial von 0, -10, -20, -30, -40, -50 bzw. -70 (für 2 s), zurück zu -60 mV gemessen. Diese Messungen waren gefolgt von einem schnellen Einwasch von 20 μ M XE 991 (Tocris Bioscience, Bristol, UK) um den M-Typ Kaliumstrom zu blockieren. Durch Subtraktion der jeweiligen Stromantworten in Abwesenheit und mit XE 991 in der Badlösung ergaben sich die jeweiligen pharmakologisch isolierten M-Typ Kaliumströme. Es erfolgte eine exponentielle

Kurvenanpassung der einzelnen *Tail*-Ströme mittels eines Algorithmus der Clampfit 9.0 Software (Molecular Devices, CA, USA), was die absoluten Stromamplituden am Beginn des jeweiligen Spannungssprunges zu -60 mV ergab.

Die Differenzströme sowohl von I_{NaP} als auch von I_M wurden in Leitfähigkeiten ($G(V)$) umgerechnet (s. Gleichung 1).

$$\text{Gleichung 1: } G(V) = I(V) / (V - V_{rev})$$

wobei $I(V)$ der Stromamplitude, V dem Kommandopotenzial und V_{rev} dem jeweiligen Umkehrpotenzial (Na^+ +61 mV, K^+ -103,5 mV) entspricht.

Mit Hilfe einer Kurvenanpassung der Boltzmann-Gleichung wurden die maximale Leitfähigkeit und die halbmaximale Aktivierung ermittelt (s. Gleichung 2).

$$\text{Gleichung 2: } G(V) = G_{max} / (1 + \exp((V_{50} - V) / k_m))$$

wobei $G(V)$ der Leitfähigkeit, G_{max} der maximalen Leitfähigkeit, V_{50} dem Membranpotenzial bei welchem $G(V)$ halbmaximal ist, V dem Kommandopotenzial und k_m der Steigung bei V_{50} entspricht.

Die Kurvenanpassung erfolgte in allen Fällen durch einen Levenberg-Marquardt-Algorithmus. Wurden während der Messung des I_{NaP} durch *Space clamp*-Problematik transiente Einwärtsströme ausgelöst, wurden diese manuell vor der Kurvenanpassung entfernt. In einigen Experimenten waren die M-Typ Kaliumleitfähigkeiten so gering, dass keine Kurvenanpassung mittels der Boltzmann-Gleichung gelang. In diesem Falle wurden als maximale Leitfähigkeit der Mittelwert der Leitfähigkeiten, ausgelöst durch einen Spannungssprung von 0 und -10 mV, verwendet. Die gesamte sequenzielle Messung dauerte weniger als 10 Minuten. Es wurden nur Zellen verwendet, deren Membranpotenzial während des gesamten Experiments negativer als -60 mV waren.

2.5 Immunfluoreszenz-Färbungen

Die Immunfluoreszenz-Färbungen wurden nach folgendem Protokoll angefertigt. 8-10 Wochen alte männliche *C57Bl/6*-Mäuse wurden durch eine intraperitoneale Injektion ei-

ner Mischung aus Ketamin 10 % (100 mg/kg) und Rompun 2 % (15 mg/kg) anästhesiert. Nachdem die Reflexe nicht mehr auszulösen waren, wurden die Tiere mit 4 ml PBS (Biochrome AG, Berlin) und anschließend mit 8 ml einer 4 % PFA-Lösung (Sigma, Steinheim) transkardial perfundiert. Die Perfusionsgeschwindigkeit entsprach dem normalen Herzzeitvolumen von 15-20 ml/min. Anschließend wurden die Hirne eine Stunde in 4 % PFA nachfixiert.

Danach wurden 600-800 µm dicke koronale Hirnschnitte mit Hilfe eines Vibratoms hergestellt und diese kryoprotektiert in Einbetttschälchen (Cryomold Standard Tissue-Tek, Sakura, Zoeterwoude, NL) und *Tissue-Tek* (O.C.T. Compound, Sakura, Zoeterwoude, NL) auf Metallblöcken in flüssigem Stickstoff (Linde, Bonn) gefroren. Diese wurden nun vor der weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert. Vor Beginn des Färbeprotokolls wurde das gefrorene Gewebe in 10-20 µm dicke Schnitte an einem Kryostat (Microm HM 560, Thermo Scientific, Schwerte) geschnitten und anschließend auf Objektträgern (Super-frost Plus, Thermo Scientific, Braunschweig) wenige Stunden luftgetrocknet.

Nun wurden die auf den Objektträgern fixierten Hirnschnitte dreimal für jeweils 5 min in PBS gewaschen und anschließend, um Hintergrundfluoreszenz zu verringern, in einer PBS-Lösung mit 0,25 % Triton X-100 (Sigma, Steinheim) und 5 % *Normal donkey serum* (Sigma, Steinheim) für eine Stunde geblockt. Nach einem weiteren dreimaligen Waschschriff für 5 min in PBS erfolgte die Applikation des jeweiligen Primärantikörpers (Verdünnung 1:1000) in einer PBS-Lösung mit 0,25% Triton X-100 und 5 % *Normal donkey serum*. Die Inkubation erfolgte bei 4 °C für etwa 40-44 Stunden. Die jeweiligen Primärantikörper waren ein polyklonaler *Rabbit* anti- $\text{Na}_v1.6$ (Alomone Labs, Jerusalem, Israel), ein monoklonaler *Mouse* anti-Ankyrin G (Zymed, San Francisco, CA, USA) und ein polyklonaler *Rabbit* anti-KCNQ2 (PA1-929, Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA). Für Doppelimmunfluoreszenzfärbungen wurden die primären Antikörper zusammen verwendet. Nach einem weiteren dreimaligen Waschschriff in PBS zu jeweils fünf Minuten erfolgte die Inkubation des sekundären Antikörpers (Verdünnung 1:1000 in PBS) für 90 Minuten. Die Sekundärantikörper waren ein *Donkey anti-mouse* (Alexa Fluor 488 Donkey Anti-Mouse IgG (H+L), Life Technologies, Darmstadt) und ein *Donkey anti-*

rabbit (Cy3 Donkey Anti-Rabbit IgG (H+L), Jackson ImmunoResearch Laboratories, Suffolk, UK).

Anschließend erfolgte ein erneutes dreimaliges fünfminütiges Waschen in PBS und dann die endgültige Fixierung mit *Mounting-medium* (Aqua-Poly/Mount, Polyscience Inc., Warrington, PA, USA) und Deckgläsern (Engelbrecht, Edermünde). Die Lagerung erfolgte lichtgeschützt bei 4 °C.

Immunfluoreszenzbilder wurden mit Hilfe eines Nikon A1/Ti-E konfokalen Mikroskops und der NIS Elements AR-Software (Nikon, Düsseldorf) aufgenommen. Es wurden ein CFI Plan Apo IR 60x WI- bzw. ein CFI Plan Apo Lambda 20x-Objektiv (Nikon, Düsseldorf) verwendet. Bilder mit verschiedenen Sekundärantikörpern wurden sequenziell aufgenommen um einen *Bleed through*-Effekt zu vermeiden.

2.6 Quantitative real-time reverse-transcription PCR

Die CA1-Regionen wurden von hippokampalen Hirnschnitten (600 µm) der jeweiligen Mausmodelle (*Scn8a*- bzw. *PM2/1*-Modell) mikrodissiziert. Die *mRNA* wurde mit Hilfe eines Dynabeads mRNA Direct Micro Kit (DynaL Biotech, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) isoliert, und für die folgende *cDNA*-Synthese wurde ein High-Capacity *cDNA* Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) nach Hersteller-Protokoll verwendet. Die Quantifizierung der *mRNA*-Level von *Ank3*, *Kcnq2*, *Kcnq3*, *Kcnq5*, *Scn1a*, *Scn2a*, *Scn8a*, *Scn1b*, *Scn2b* bzw. *Syp* wurde mit der *Real-time reverse-transcription polymerase chain reaction* (PRISM 7700; PE Biosystems, Foster City, CA, USA) durchgeführt. Die *Primer* für die genannten *mRNAs* wurden mit der Primer Express Software (PE Biosystems, Foster City, CA, USA) hergestellt. Die verschiedenen Sequenzen sind in Tabelle 1 gezeigt. Nach Durchsuchen der GenBank-Datenbank mit dem BLASTN Programm, fanden sich keine signifikanten Homologien der Amplikonsequenzen mit anderen schon früher charakterisierten Genen. Die *Real-time reverse-transcription polymerase chain reaction* wurde in einem 6,25 µl Reaktionsvolumen durchgeführt, welches 3,125 µl eines SYBR Green PCR Master Mix (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 0,1875 µl des *Forward* und *Reverse primers* (10 pmol/ml), 1,5 µl von Diethylpyrocarbonat-H₂O und *cDNA*, gelöst in 1,25 µl Diethylpyrocarbonat-H₂O, enthielt.

Nach einer zehnminütigen Vorinkubation bei 94 °C wurden 40 Polymerase-Reaktionszyklen (20 s bei 94 °C, gefolgt von 30 s bei 59 °C und 40 s bei 72 °C) ausgeführt. Die relative Quantifizierung der initialen *mRNA*-Kopien wurde mit Hilfe der $\Delta\Delta C_t$ -Methode berechnet (Fink et al., 1998) und *Syp* als endogenes Referenzgen verwendet. Das grüne Fluoreszenzsignal des SYBR Green PCR Master Mix wurde in jedem Zyklus gemessen.

Tab. 1: Es sind die Vorwärts- und Rückwärts-Nukleotid-Sequenzen der einzelnen für die *RT-PCR* verwendeten *Primer* dargestellt. Weiter sind die Zugangsnummern der GenBank-Datenbank aufgelistet.

Gen	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')	GenBank Zugangsnummer
<i>Ank3</i>	CATGACCCAGTTGATGGTTG	TTCTCCCGTGAGGTATGAGG	NM_170728
<i>Kcnq2</i>	TACCCCTGGCCTCAAAGTTA	TATGGGCGCAGACTCTCTTT	NM_010611
<i>Kcnq3</i>	CTCAGAAAGGGTCAGCATTTACCT	GCTGCCCTGGCTACATATGG	NM_152923
<i>Kcnq5</i>	GCTCAGAAGTCTCCGGTTCCT	CTTCCAGGTCCCTCCCCTT	NM_001160139
<i>Scn1a</i>	CTTGAGCCCGAAGCTTGCT	TCCTTCTTCCACGCTGATTTG	NM_018733
<i>Scn2a</i>	CATCGTCTTCATGATTCTGCTCA	GGTTTTTCGCTGCTCGATGTA	NM_001099298
<i>Scn8a</i>	CATCTTTGACTTTGTGGTGGTCAT	TGACGCGGAATAGGGTCG	NM_001077499
<i>Scn1b</i>	CGAATGTCACGTCTACCGTCT	CACGATGGATGCCATATCTCT	NM_011322
<i>Scn2b</i>	TGGACTIONACCAGGAGTGTAGCAATT	CTCCAAACCGCTCCAGCTT	NM_001014761
<i>Syp</i>	TTCAGGACTCAACACCTCGGT	CACGAACCATAGGTTGCCAAC	NM_009305

2.7 Datenanalyse und Statistik

Alle gezeigten Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) dargestellt. Zum Vergleich der Mittelwerte zweier Gruppen wurde ein zweiseitiger Student's t-Test verwendet. Die Analyse der *mRNA*-Expression erfolgte mittels eines Mann-Whitney U-Tests. Für alle Tests wurde das Signifikanz-Level auf $p < 0,05$ gesetzt.

Die Datenanalyse erfolgte mit Hilfe der Clampfit 9.0 Software (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA), IGOR (Wavemetrics Inc.; Lake Oswego, OR, USA), Graphpad Prism (Graphpad Software, San Diego, CA, USA) und Microsoft Office Excel 2007 (Microsoft, Redmond, WA, USA).

2.8 Versuchsdurchführung und Datenauswertung

Alle in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Versuche und Messungen wurden von mir durchgeführt. Ebenso wurden die Daten von mir ausgewertet.

Abweichend hiervon wurden im *Kcnq2^{flox}*-Modell die Messungen der *Whole-cell current-clamp*-Experimente nach meinen Vorgaben von Dominik Holtkamp (Bonn) durchgeführt. Die Auswertung der Daten erfolgte durch mich.

Im *NMF134^{mut}*-Modell wurden die Messungen und die Auswertung der Daten nach meinen Vorgaben von Priv.-Doz. Dr. Axel Neu (Hamburg) durchgeführt.

Im *Q2-ABP*-Modell wurden die Messungen der *Whole-cell current-clamp*-Experimente nach meinen Vorgaben von Dr. Christina Müller (Bonn) durchgeführt. Die Auswertung der Daten erfolgte durch mich.

Die *Quantitative real-time reverse-transcription PCR*-Experimente und deren Auswertung wurden von Dr. Julika Pitsch (Bonn) durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1 Der persistierende Natrium- und der M-Typ Kaliumstrom zeigen eine positive Korrelation in CA1-Pyramidenzellen

Eine etwaige Ko-Regulation zwischen persistierendem Natrium- und M-Typ Kaliumstrom sollte zu einer positiven Korrelation beider Ströme in Pyramidenzellen führen. In früheren Arbeiten wurden Korrelationen von verschiedenen *messenger RNA*-Leveln, die für bestimmte Ionenkanäle kodieren, beschrieben (Tobin et al., 2009; Bergquist et al., 2010). Korrelationen in *mRNA*-Leveln müssen, aufgrund vielfältiger posttranskriptionaler und posttranslationaler regulatorischer Möglichkeiten, aber nicht automatisch zu Korrelationen auf Proteinebene und, da auch membranständige Ionenkanäle modifiziert werden können, zu Korrelationen von Ionenströmen führen. Diese elektrophysiologisch messbaren Ionenströme sind es aber, welche für das Feuerverhalten eines Neurons entscheidend sind. Daher sollte in der vorliegenden Arbeit mittels eines speziellen *Whole-cell voltage-clamp*-Protokolls nach einer direkten I_{NaP}/I_M -Korrelation in derselben Nervenzelle gesucht werden (s. Abb. 1, A). In früheren Studien wurde der persistierende Natriumstrom mit Cäsium-basierten Intrazellulärlösungen gemessen, da so durch die Blockade von Kaliumkanälen eine bessere Spannungsklemme erreicht werden kann (Royeck et al., 2008). Solche Lösungen würden aber das anschließende Messen des M-Typ Kaliumstroms in derselben Zelle unmöglich machen. Es wurde daher auf Cäsium in der Innenlösung verzichtet und lediglich der A-Typ Kaliumstrom (I_A) und Kalziumströme mit 2 mM 4-Aminopyridin bzw. 200 μ M Cadmium pharmakologisch blockiert (s. Material und Methoden). Zur Messung des persistierenden Natriumstroms und um schnelle transiente Natriumströme zu inaktivieren, wurde eine langsame Spannungsrampe von -90 mV bis -20 mV (50 mV/s) verwendet. Dieselbe Messung wurde mit 1 μ M des Natriumkanalblockers Tetrodotoxin (TTX) in der Badlösung wiederholt, um durch Subtraktion beider Stromspuren den pharmakologisch isolierten I_{NaP} zu erhalten (s. Abb. 1, B). Anschließend wurde in Anwesenheit von TTX der M-Typ Kaliumstrom gemessen. Hierzu wurde die Zelle bei -60 mV geklemmt und der Strom nach zweisekündigen Spannungssprüngen von verschiedenen Haltepotentialen (0, -10, -20, -30, -40, -50 und -70 mV) zurück zu einer Haltespannung von -60 mV als *Tail*-Strom gemessen. Dieser *Tail*-Strom stellt die langsame Deaktivierung des nicht-inaktivierenden M-Typ Kaliumstroms dar. Auch hier wurde durch Wiederholung der Messung nach Einwaschen von 20 μ M des

spezifischen I_M -Blockers XE 991 und Subtraktion der erhaltenen Stromspuren der pharmakologisch isolierte I_M gemessen (s. Abb. 1, C). Die Differenzströme von I_{NaP} und I_M wurden in Leitfähigkeiten umgerechnet und mit Hilfe einer Kurvenanpassung der Boltzmann-Gleichung wurde die maximale Leitfähigkeit und die halbmaximale Aktivierung ermittelt (s. Material und Methoden). Mittels dieses Protokolls wurde der persistierende Natrium- und der M-Typ Kaliumstrom sequenziell in 26 CA1-Pyramidenzellen von adulten *C57Bl/6*-Mäusen gemessen. Hier fand sich eine positive Korrelation beider Ströme, welche, auch wenn Korrelationen keine Aussage über die zugrundeliegenden Ursachen zulassen, als Indiz für eine Ko-Regulation oder zumindest für einer Abhängigkeit beider Ströme von einander gesehen werden kann (Pearson $r=0,6757$; $p<0,0005$) (s. Abb. 1, D).

Zusätzlich wurde die Lokalisation der $Na_v1.6$ - und der $K_v7.2$ -Untereinheit am Axoninitialsegment in adulten *C57Bl/6*-Tieren überprüft. Abbildung 2 zeigt die immunhistologischen Färbungen, in denen $Na_v1.6$ - bzw. $K_v7.2$ -spezifische Antikörper verwendet wurden (s. Material und Methoden).

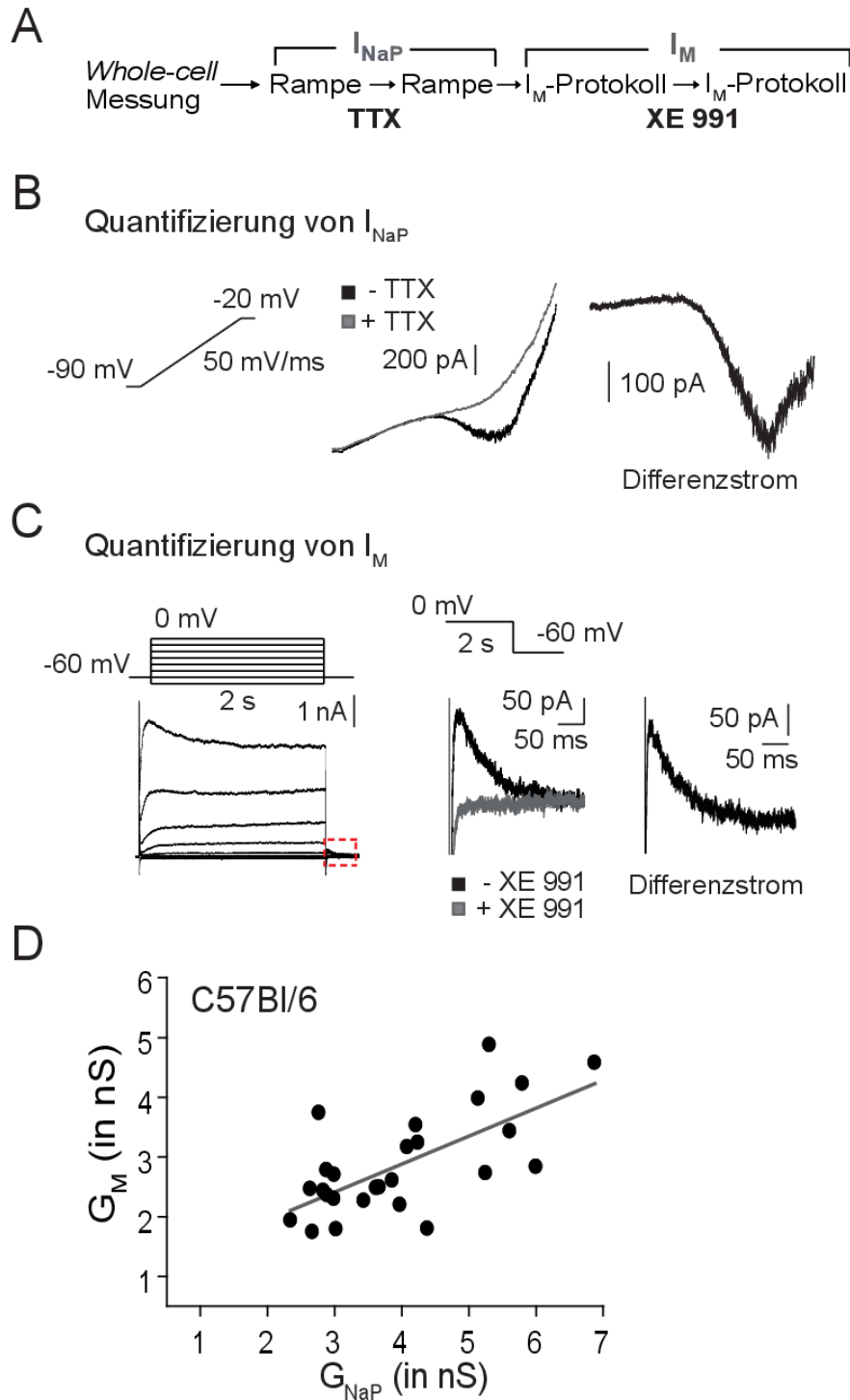


Abb. 1: Sequenzielle Messung von I_{NaP} und I_M in derselben CA1-Pyramidenzelle

(A) Schematische Darstellung der Abfolge der einzelnen Strommessungen im sequenziellen I_{NaP}/I_M -Protokoll. (B) zeigt die Spannungsrampe zur Messung des I_{NaP} , den Strom in Ab- bzw. Anwesenheit von TTX und den pharmakologisch isolierten Strom. In (C) ist das Protokoll zur I_M -Messung, I_M ohne bzw. mit XE 991 in der Badlösung und der pharmakologisch isolierte Strom dargestellt. (D) I_{NaP} und I_M zeigen eine positive Korrelation, wenn sequenziell in derselben Zelle gemessen (Pearson $r=0,6757$, $p=0,0002$, $n=26$).

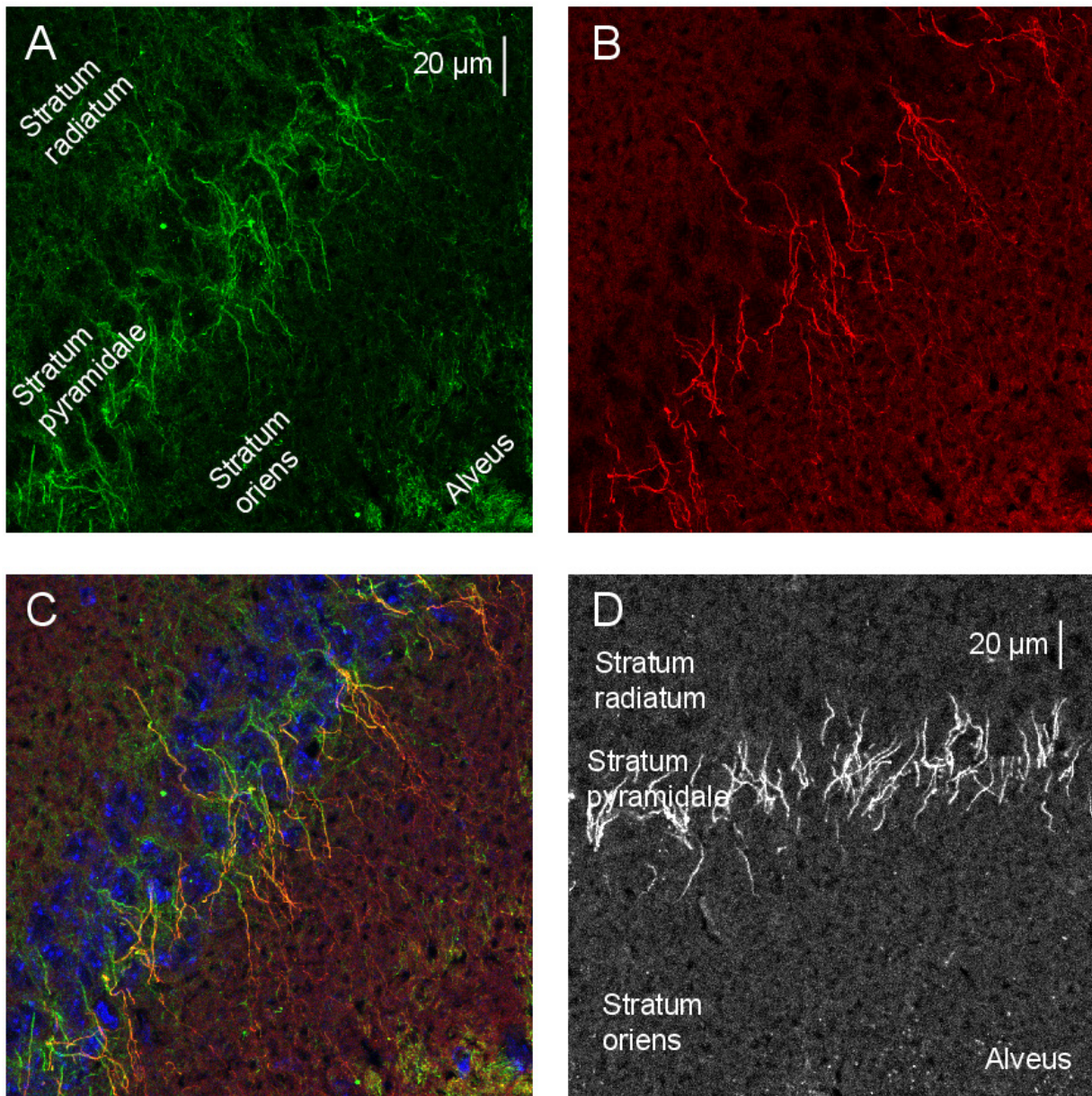


Abb. 2: Immunhistologie von $\text{Na}_v1.6$ und $\text{K}_v7.2$ in CA1

(A) zeigt eine Antikörperfärbung in der Falschfarbe Grün gegen Ankyrin G, einen Marker für das Axoninitialsegment. Im selben Hirnschnitt ist in (B) mittels eines spezifischen Antikörpers die $\text{K}_v7.2$ -Untereinheit in der Falschfarbe Rot markiert. (C) ist die Superposition von (A) und (B) und zeigt als grün-rote Überlagerung die Lokalisation der $\text{K}_v7.2$ -Untereinheit am Axoninitialsegment. Zusätzlich sind die Zellkerne mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI dargestellt. (D) zeigt die $\text{Na}_v1.6$ -Untereinheit in einem anderen Hirnschnitt. (A), (B) und (C) 60x Objektiv, Zoom 1,23x, Pinhole 0,7; (D) 20x Objektiv, Zoom 3x, Pinhole 1,2.

3.2 Reduktion von I_M in einem Mausmodell mit chronisch verminderten I_{NaP} (*Scn8a^{med}*-Modell)

Nachdem eine Korrelation von I_{NaP} und I_M gezeigt werden konnte, sollte untersucht werden, ob die systematische Manipulation der Größen von I_{NaP} bzw. I_M den jeweiligen anderen Strom, im Sinne einer Ko-Regulation, beeinflusst. Als Modell für eine chronische I_{NaP} -Reduktion, diente die *Scn8a^{med}*-Mauslinie, die einen um etwa 40% verminderten persistierenden Natriumstrom in CA1-Pyramidenzellen aufweist (Royeck et al., 2008).

Bei Verwendung des oben vorgestellten Protokolls zur sequenziellen I_{NaP}/I_M -Messung in derselben Zelle fand sich die erwartete I_{NaP} -Reduktion um 42 %, welche der von Royeck et al. (2008) gemessenen entsprach. Dies zeigt auch, dass mit der hier verwendeten Cs^+ -freien Innenlösung eine ausreichend gute Spannungsklemme für zuverlässige Messungen zu erreichen ist. Zusätzlich zur Reduktion im persistierenden Natriumstrom fand sich eine Verminderung im M-Typ Kaliumstrom um 25 % (t-Test: $p < 0,05$, s. Abb. 3, A und B). Um zu untersuchen, inwiefern diese Reduktion von I_{NaP} und I_M das Feuerverhalten der Zellen beeinflusst, wurde das Entladungsverhalten mit Hilfe scharfer Mikroelektroden gemessen. Es zeigte sich, dass der Aktionspotenzialschwellenwert in den mutierten Tieren um etwa 7 mV zu depolarisierteren Spannungswerten verschoben ist (t-Test: $p < 0,005$), hingegen blieb die Fläche und Amplitude der „aktiven“ Aktionspotenzialnachdepolarisation in beiden Gruppen gleich. „Aktiv“ meint in diesem Falle die Differenz aus Fläche bzw. Amplitude der Aktionspotenzialnachdepolarisation und der Spannungsantwort, die durch eine gerade noch niederschwellige (*subthreshold*) Strominjektion ausgelöst wurde. Durch diese Art der Auswertung sollte verhindert werden, dass es in der Gruppe der Mutanten, die wegen eines depolarisierteren Aktionspotenzialschwellenwertes größere Strominjektion zum Auslösen eines AP benötigen, zu falsch-großen Ergebnissen durch eine erhöhte passive Spannungsantwort kommt (Royeck et al., 2008). Auch die mit scharfen Mikroelektroden gemessenen passiven Eigenschaften unterschieden sich nicht in Membranwiderstand und Zellkapazität (s. Tab. 2). Diese Ergebnisse der Analyse des Feuerverhaltens, gemessen mit scharfen Mikroelektroden, bestätigen die *Whole-cell current-clamp*-Messungen von Royeck et al. (2008) (s. Abb 3, C und D).

Die gefundene Reduktion im M-Typ Kaliumstrom könnte durch kompensatorische Mechanismen auf unterschiedlichen Ebenen zustande kommen. Daher wurde eine semi-quantitative Messung der *mRNA*-Level von *Kcnq2*-, *Kcnq3*- und *Kcnq5*-Untereinheiten mittels quantitativer *Real-time RT-PCR* durchgeführt, um eine Aussage treffen zu können, ob die Verminderung von I_M durch eine verminderte Expression der Gene oder eher durch posttranskriptionale Mechanismen, wie z.B. einen veränderten Kanaltransport (*trafficking*) oder Modifikationen durch Proteinkinasen, zu erklären ist. Hierzu wurde eine Mikrodissektion der CA1-Region des Hippokampus in *Scn8a^{med}*- und Kontrolltieren durchgeführt und bei der nachfolgenden *Real-time RT-PCR* die *mRNA*-Level relativ zur *mRNA*-Menge von *Syp*, welches für Synaptophysin, einem präsynaptischen Protein, kodiert, gemessen (s. Material und Methoden). Hierbei zeigte sich kein Unterschied in den Expressionsleveln der *Kcnq2*-, *Kcnq3*- bzw. *Kcnq5*-Untereinheiten. Ebenso waren die Expressionslevel von *Ank3*, welches für das Protein Ankyrin G kodiert, und *Scn1b* in beiden Gruppen unverändert. Die Reduktion des persistierenden Natriumstroms im *Scn8a^{med}*-Modell führt also zu einer Verminderung im M-Typ Kaliumstrom, welche nicht durch eine veränderte Genexpression zu erklären ist (s. Abb. 4).

(A) zeigt repräsentative Messungen von I_{NaP} und I_M in Nervenzellen in *Scn8a^{wt}*- bzw. *Scn8a^{med}*-Tieren. In (B) sind die Veränderungen in den Leitfähigkeiten von I_{NaP} bzw. I_M zwischen beiden Gruppen dargestellt (t-Test: $p < 0,01$ bzw. $p < 0,05$; $n = 9$; 11). (C) zeigt beispielhafte Aktionspotenziale und (D) die unveränderte Fläche bzw. Amplitude der Aktionspotenzialnachdepolarisation und den zu depolarisierteren Membranspannungen veränderten Aktionspotenzialschwellenwert (t-Test: $p < 0,01$; $n = 7$; 5). Werte als Mittelwerte \pm SEM.

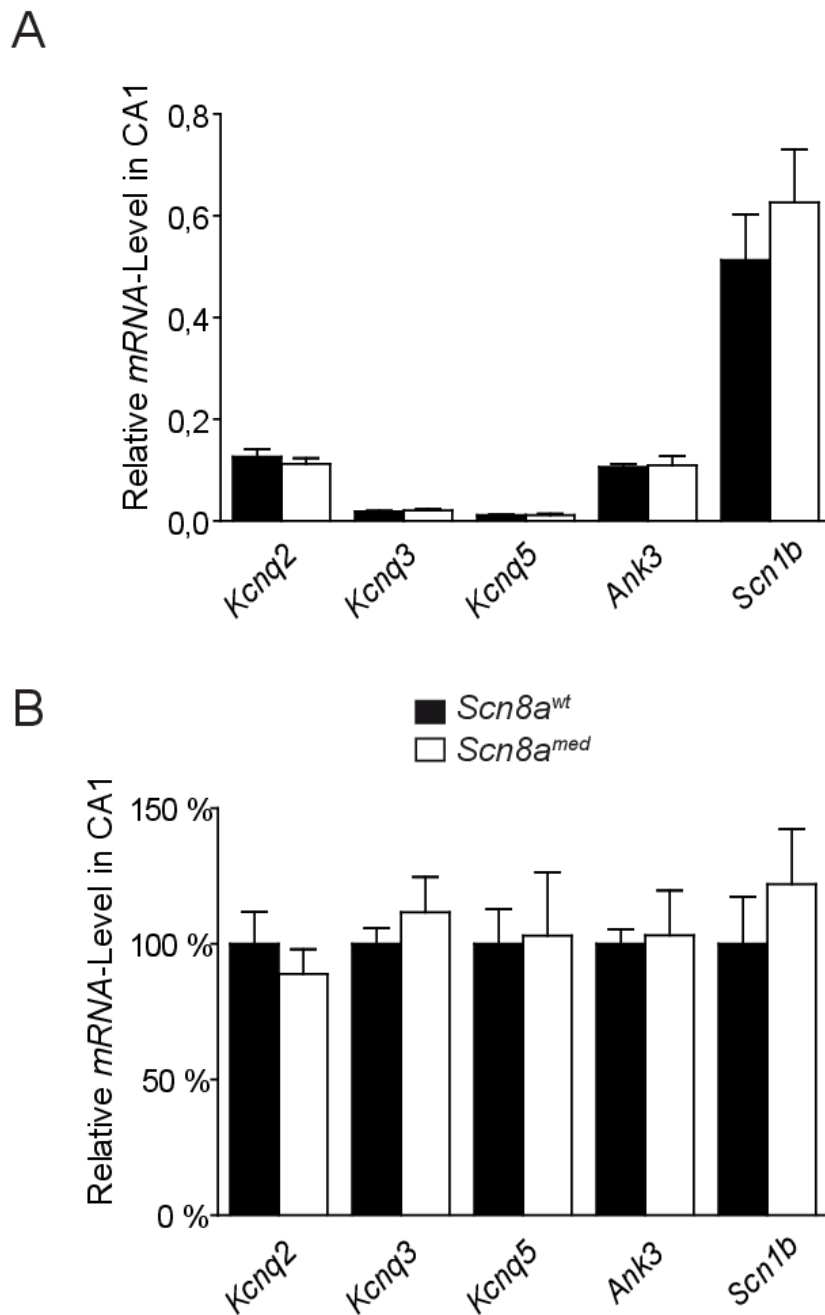


Abb. 4: *mRNA*-Expressionslevel in *Scn8a*^{wt}- und *Scn8a*^{med}-Tieren

(A) zeigt die relativen *mRNA*-Expressionslevel von *Kcnq2*, *Kcnq3*, *Kcnq5*, *Ank3* und *Scn1b* bezogen auf *Syp* in der CA1-Region des Hippokampus. Diese unterschieden sich nicht zwischen beiden Gruppen (n=6; 6). In (B) sind diese auf die jeweilige Kontrollgruppe bezogen normalisiert dargestellt. Werte als Mittelwerte \pm SEM.

3.3 Unveränderter I_{NaP} in einem Mausmodell mit chronischer I_M -Reduktion durch eine dominant-negative $K_v7.2$ -Untereinheit (*P-M2/1-Modell*)

Nachdem sich eine Reduktion des M-Typ Kaliumstroms bei chronischer Reduktion des I_{NaP} im *Scn8a^{med}*-Modell gezeigt hatte, sollte nun untersucht werden, ob ebenso eine chronische I_M -Reduktion den persistierenden Natriumstrom verringert. Hierzu sollten drei verschiedene genetisch veränderte Mausmodelle benutzt werden. Als erstes Modell wurde mit den *P-M2/1*-Mäusen eine transgene Mauslinie benutzt, die unter Verwendung eines durch Doxyzyklin-kontrollierbaren *Tet-Off*-Konstrukts eine $K_v7.2$ -Untereinheit mit Porenmutation (*hQ2-G279S*) exprimiert. Diese porenmutierte $K_v7.2$ -Untereinheit besitzt keine Leitfähigkeit für Kaliumionen und führt durch Assemblierung mit nativen K_v7 -Untereinheiten dominant-negativ zur M-Typ Kaliumstrom-Reduktion (Peters et al., 2005). Die in dieser Studie untersuchte Mauslinie unterschied sich von der von Peters et al. (2005) verwendeten lediglich durch eine autosomale Insertion des porenmutierten *hKCNQ2*-Konstrukts. Peters et al. (2005) konnten zeigen, dass eine I_M -Reduktion durch Transgenexpression in den ersten Lebenswochen zu morphologischen Veränderungen im Hippokampus, zu hyperaktivem Verhalten und zu regelmäßigen epileptischen Anfällen führt. Wurde hingegen die Transgenexpression durch Doxyzyklin-Gabe in den ersten Lebenswochen unterdrückt, fand sich bei gleichstarker I_M -Reduktion lediglich eine erhöhte Erregbarkeit in den telemetrischen Elektrokortikographie-Ableitungen. Daher sollte die I_M -Reduktion durch Doxyzyklin-Gabe auf das adulte Alter beschränkt werden, um morphologische Veränderungen zu vermeiden. Allerdings zeigte sich bei zwei Versuchen des Doxyzyklin-Entzugs in adulten Mäusen, dass keine signifikante M-Typ Kaliumstrom-Reduktion gemessen werden konnte, wenn die Tiere erst mehrere Wochen bzw. mehrere Monate alt von Doxyzyklin entwöhnt wurden (insgesamt 80 gemessene Zellen in Kontroll- und transgener Gruppe, Daten nicht gezeigt). In einem dritten Versuch wurden die Tiere deshalb sofort nach Geburt von Doxyzyklin entzogen und zeigten nun im adulten Alter eine signifikante I_M -Reduktion um 31 % (t-Test: $p < 0,01$, s. Abb. 5, A, B und C). Die Spannungsabhängigkeit des I_M unterschied sich dabei nicht zwischen beiden Gruppen (s. Abb. 5, D). Trotz dieser Reduktion im I_M konnte zwischen beiden Gruppen in den sequenziellen I_{NaP}/I_M -Messungen keine Veränderung im persistierenden Natriumstrom gefunden werden (s. Abb. 5, C).

Zusätzlich zu den elektrophysiologischen Messungen wurde auch in diesem Modell eine quantitative *Real-time RT-PCR* zur Untersuchung der *mRNA*-Level von *Kcnq2*, *Kcnq3*, *Kcnq5*, *Ank3*, *Scn1b*, *Scn2b*, *Scn1a*, *Scn2a* und *Scn8a* in der CA1-Region durchgeführt. Auch dabei fand sich zwischen beiden Gruppen auf *mRNA*-Ebene keine Veränderung in den untersuchten Genen (s. Abb. 6). Eine chronische Verminderung im M-Typ Kaliumstrom durch Expression einer dominant-negativen $K_v7.2$ -Untereinheit hat also keinen Einfluss auf den persistierenden Natriumstrom und die Expression verschiedener Natriumkanaluntereinheiten.

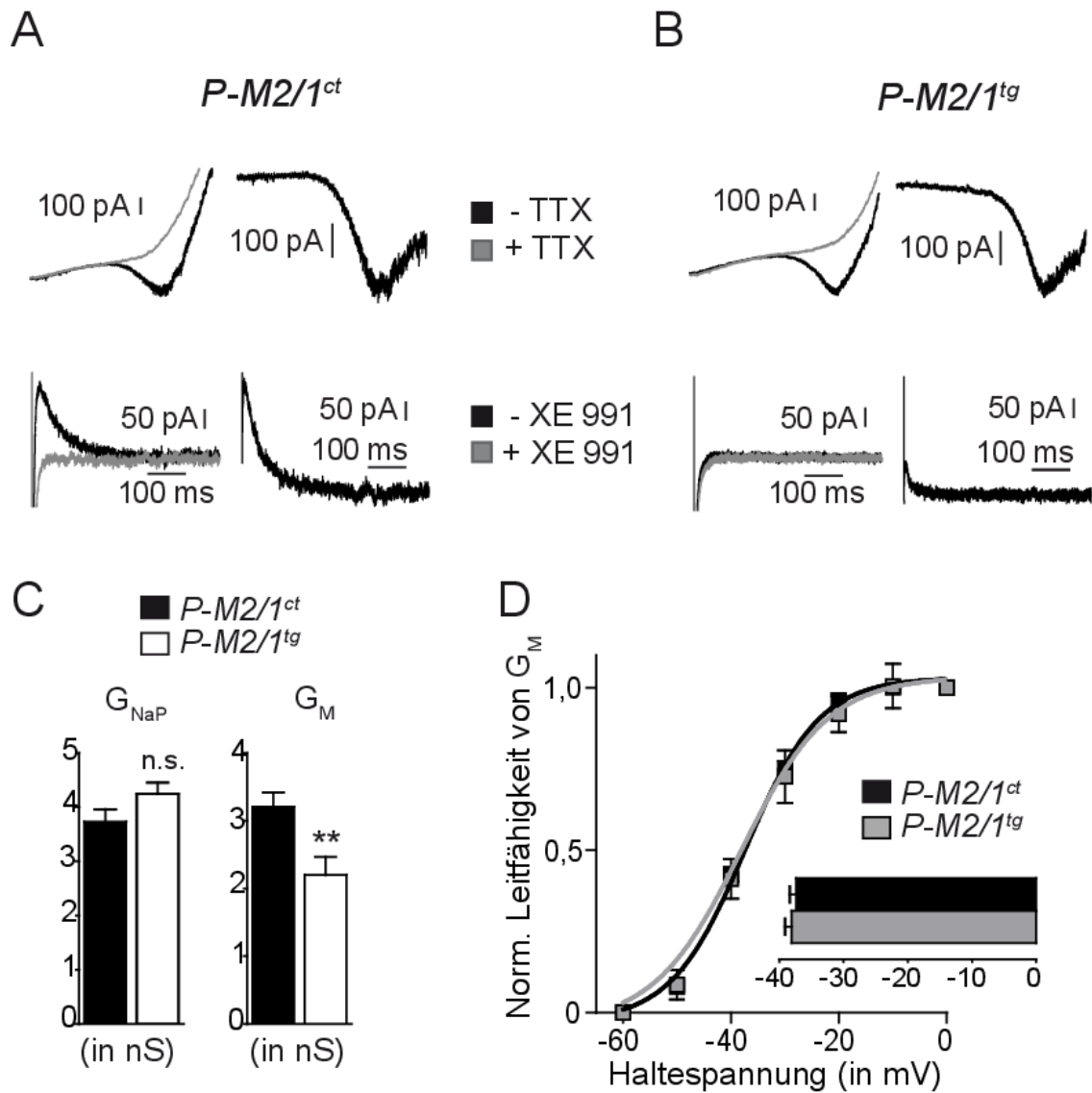


Abb. 5: Unveränderter I_{NaP} bei chronischer I_M -Reduktion durch eine dominant-negative $K_v7.2$ -Untereinheit

(A) und (B) zeigen repräsentative Messungen von I_{NaP} und I_M . In (C) sind die Leitfähigkeiten des persistierenden Natriumstroms und des verminderten M-Typ Kaliumstroms (t-Test: $p < 0,01$; $n = 16$; 16) als Balkendiagramme dargestellt. Ein Diagramm der unveränderten spannungsabhängigen Aktivierung von I_M mit $V_{1/2}$ findet sich in (D). Werte als Mittelwerte \pm SEM.

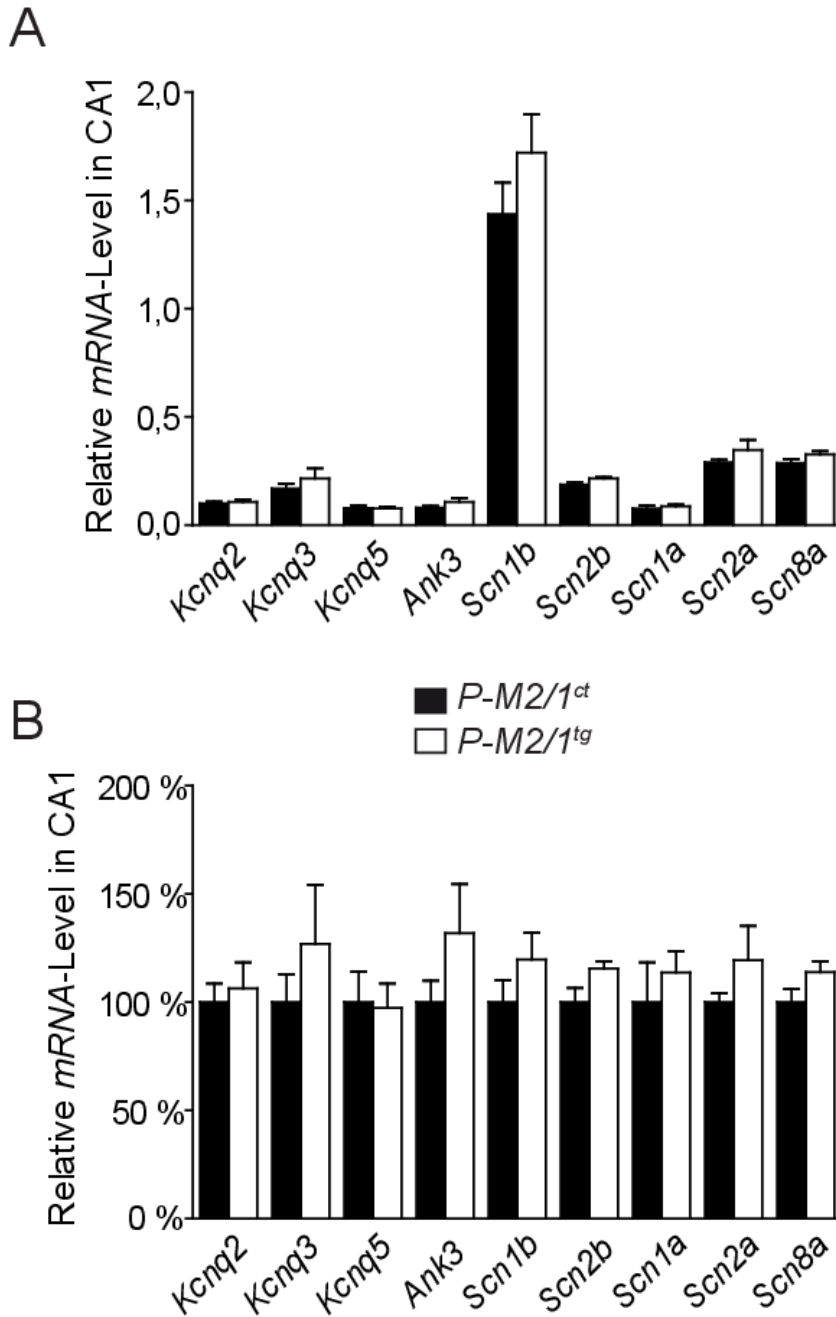


Abb. 6: Ergebnisse der *Quantitative real-time RT-PCR* der CA1-Region in $P-M2/1^{ct}$ - und $P-M2/1^{tg}$ -Mäusen

(A) zeigt die relativen *mRNA*-Expressionslevel von *Kcnq2*, *Kcnq3*, *Kcnq5*, *Ank3*, *Scn1b*, *Scn2b*, *Scn1a*, *Scn2a* und *Scn8a* bezogen auf *Syp* in der CA1-Region des Hippokampus. Diese unterschieden sich nicht zwischen beiden Gruppen (n=8; 7). In (B) sind diese auf die jeweilige Kontrollgruppe bezogen normalisiert dargestellt. Werte als Mittelwerte \pm SEM.

3.4 Vergrößerter I_{NaP} in einem Modell mit chronischer I_M -Reduktion durch *Kcnq2*-Deletion (*Kcnq2^{flox}*-Modell)

Um zu überprüfen, ob durch andere Mausmodelle mit M-Typ Kaliumstromreduktion eine Beeinflussung des persistierenden Natriumstroms erreicht werden kann, wurde außerdem eine Mauslinie untersucht, welche durch Deletion des *Kcnq2*-Gens eine Verminderung im M-Typ Kaliumstrom aufweist. In dieser transgenen Mauslinie wird ein *Cre/loxP*-System verwendet, in welchem das *Kcnq2*-Gen mit *loxP*-Stellen flankiert ist. Unter dem *CaMKII*-Promoter und somit neuronenspezifisch, wird die Cre-Rekombinase exprimiert, welche dann für die Exzision von *Kcnq2* verantwortlich ist. In Mäusen, homozygot für das „gefloxte“ Allel, wird somit das *Kcnq2*-Gen nicht mehr abgelesen. Anders als im vorherigen Modell, bei dem $K_v7.2$ -Untereinheiten mit dominant-negativem Konstrukt am Axoninitialsegment lokalisiert sein sollten, fehlt in diesem Modell nun die $K_v7.2$ -Untereinheit komplett. Ob dies nun eine andersartige Regulation des persistierenden Natriumstroms im Vergleich zum *P-M2/1*-Modell zur Folge hat, wurde erneut mit der sequenziellen I_{NaP}/I_M -Messung untersucht. Es zeigte sich entgegen der aus der Hypothese resultierenden Erwartung bei Messungen in adulten Tieren, dass bei einer M-Typ Kaliumstrom-Reduktion um 46 % der persistierende Natriumstrom um 29 % in der *Kcnq2^{flox}*-Gruppe hochreguliert war (t-Test: $p < 0,01$ bzw. $p < 0,05$, s. Abb 7, A, B und C). Die Spannungsabhängigkeit des I_M unterschied sich dabei nicht zwischen beiden Gruppen (s. Abb 7, D).

Ein möglicher Einfluss dieser Veränderungen auf das Feuerverhalten wurde mittels *Whole-cell current-clamp*-Messungen untersucht. Hier zeigten sich allerdings weder in den passiven Eigenschaften noch im aktiven Feuerverhalten, ausgelöst durch kurze (3 ms) oder lange Strominjektionen (500 ms), Unterschiede zwischen der *Kcnq2*-defizienten und der Kontrollgruppe. Interessanterweise führt also eine Hochregulation des I_{NaP} bei gleichzeitiger Verminderung des I_M durch *Kcnq2*-Deletion zu keinen messbaren Veränderungen im Feuerverhalten von CA1-Pyramidenzellen. Die Abbildung 8 stellt die Ergebnisse der *Current-clamp*-Messungen dar.

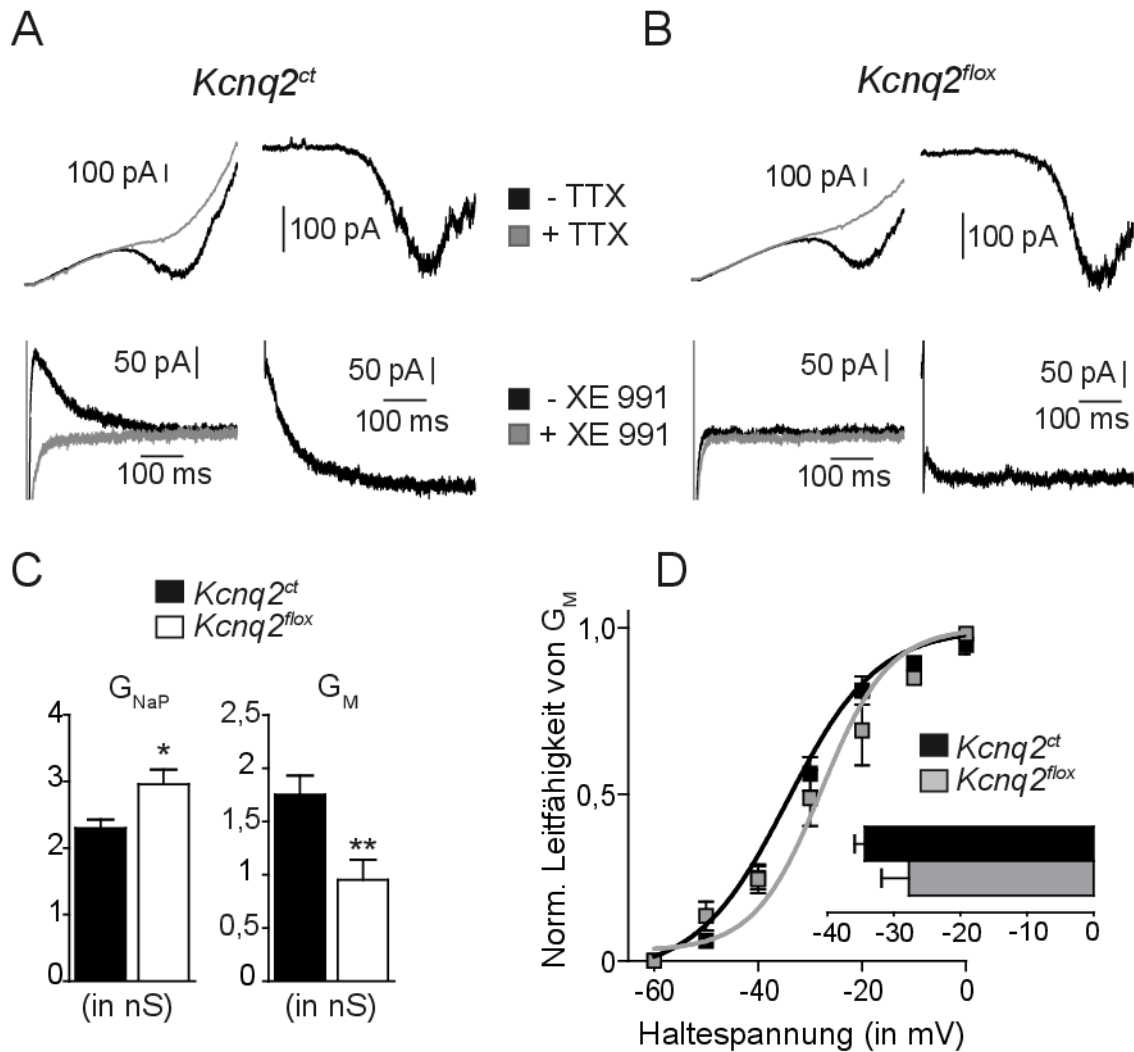


Abb. 7: Vergrößerter I_{NaP} bei chronischer I_M -Reduktion durch *Kcnq2*-Deletion (*Kcnq2^{flox}*-Modell)

(A) und (B) zeigen repräsentative Messungen von I_{NaP} und I_M . In (C) sind die Leitfähigkeiten des vergrößerten persistierenden Natriumstroms (t-Test: $p < 0,05$) und des verminderten M-Typ Kaliumstroms (t-Test: $p < 0,01$; $n = 13$; 13) als Balkendiagramme dargestellt. Ein Diagramm der spannungsabhängigen Aktivierung von I_M mit $V_{1/2}$ findet sich in (D). Die halbmaximale Aktivierung von I_M unterschied sich nicht zwischen transgener und Kontrollgruppe. Werte als Mittelwerte \pm SEM.

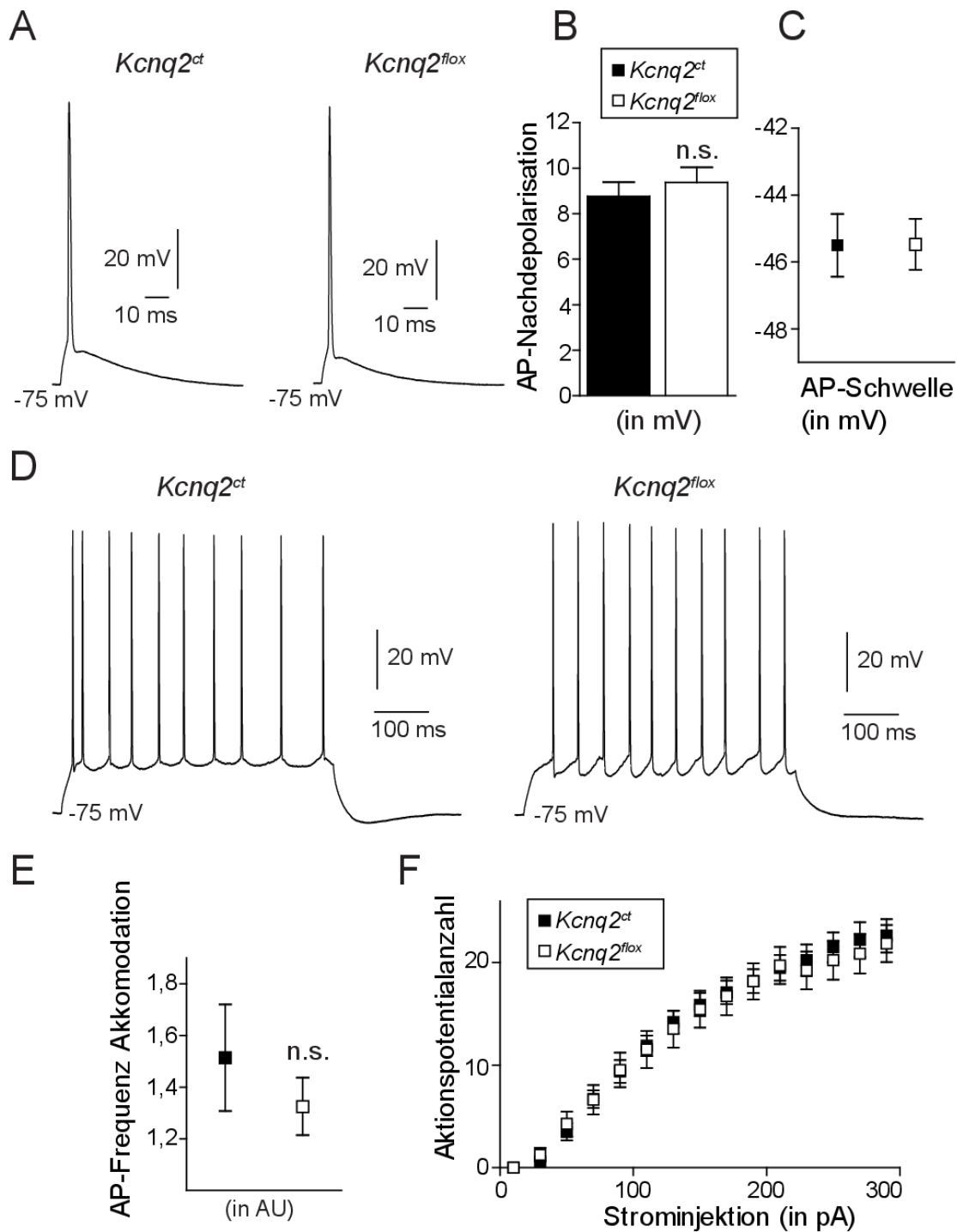


Abb. 8: Feuerverhalten in *Kcnq2^{ct}*- und *Kcnq2^{flox}*-Tieren

(A) Einzelnes Aktionspotenzial einer repräsentativen *Kcnq2^{ct}*- bzw. *Kcnq2^{flox}*-Zelle, ausgelöst durch eine 3 ms lange Strominjektion von 300 pA bzw. 320 pA. Aktionspotenzialnachdepolarisation (B) und -schwellenwert (C) zeigten keine Veränderung. (D) Feuerverhalten einer repräsentativen *Kcnq2^{ct}*- bzw. *Kcnq2^{flox}*-Zelle ausgelöst durch eine 500 ms lange Strominjektion von 110 pA. Bei diesen langen Strominjektionen fand sich kein Unterschied hinsichtlich der Akkomodation der Aktionspotenzialfrequenz (E) und der Anzahl der Aktionspotenziale pro injizierte Stromstärke (F). Werte als Mittelwerte \pm SEM; n=11; 11.

3.5 Unveränderter I_{NaP} im $NMF134^{mut}$ -Modell

Schließlich wurde als drittes Modell zur chronischen I_M -Reduktion die $NMF134$ -Mausmutante untersucht. In dieser Mausmutante führte chemische Mutagenese mit Hilfe des potenten Mutagens N-Ethyl-N-nitrosoharnstoff (ENU) zum Austausch der Aminosäure Valin durch Methionin an Position 182 im Transmembransegment S3 (Kearney et al., 2006). Es konnte gezeigt werden, dass diese Mutation in hippokampalen CA1-Zellen homozygoter Tiere einen um 50% reduzierten I_M mit zu positiveren Membranpotenzialen verschobener halbmaximaler Aktivierung (~ 5 mV) verursacht (Dirk Isbrandt, persönliche Kommunikation). Phänotypisch sind homozygote $NMF134^{mut}$ -Tiere kleiner und leichter als ihre gesunden Wurfgeschwister und zeigen aufgrund von Krampfanfällen eine erhöhte Letalität in den ersten Lebenswochen. Angesichts dieser erhöhten Letalität wurden diese Tiere im Alter von 15-16 Tagen als Modell zur Untersuchung von I_{NaP} und I_M genutzt. In den sequenziellen Messungen zeigte sich keine Veränderung des persistierenden Natriumstroms (s. Abb. 9, A, B und C). Überraschenderweise fand sich aber auch im M-Typ Kaliumstrom weder eine Reduktion noch eine Veränderung in der halbmaximalen Aktivierung (s. Abb. 9, C und D). Da dieses Modell ohne I_M -Reduktion unbrauchbar ist, soll es im Folgenden nicht weiter besprochen und diskutiert werden.

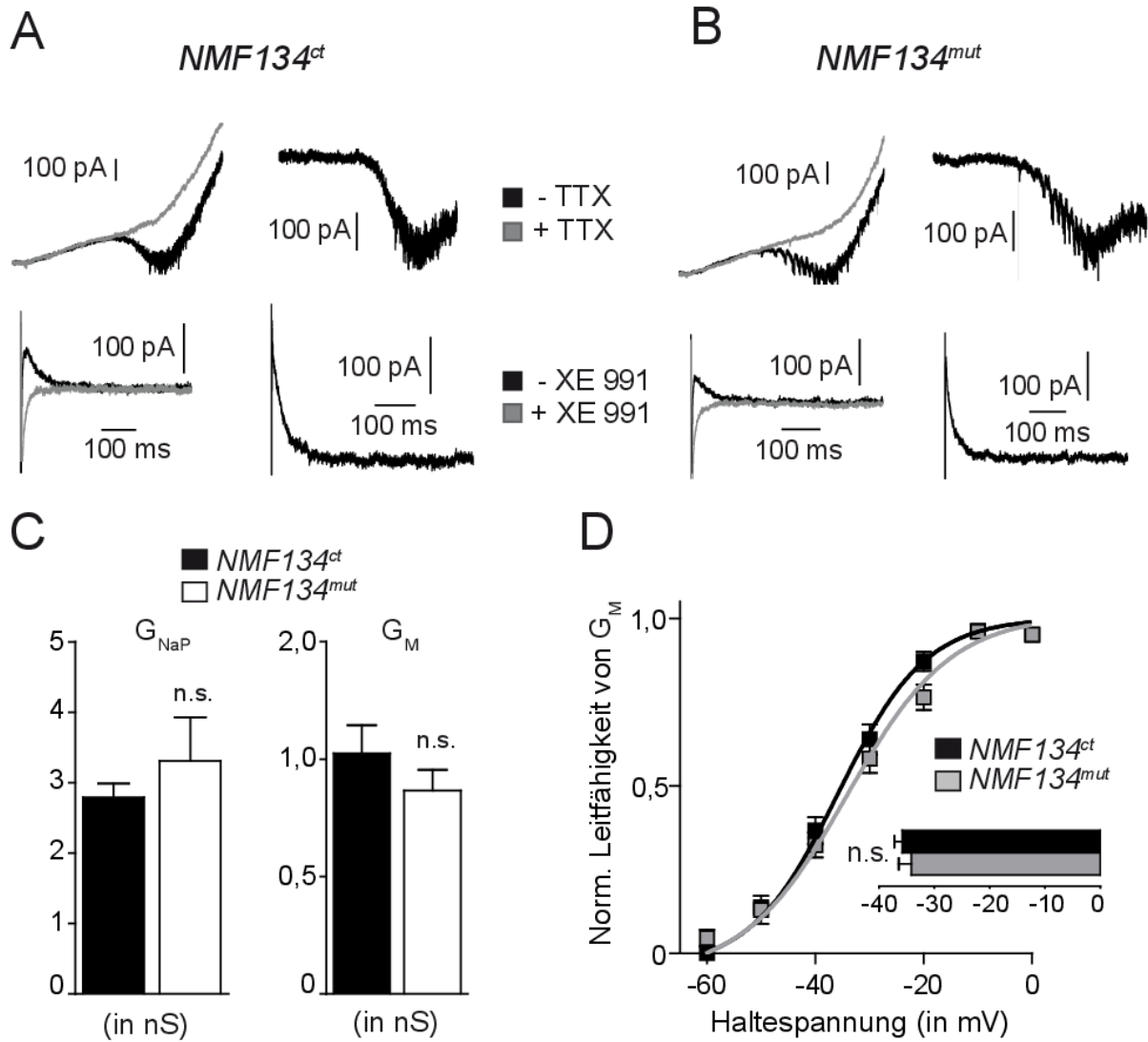


Abb. 9: Unveränderter I_{NaP} im *NMF134^{mut}*-Modell

(A) und (B) zeigen repräsentative Messungen von I_{NaP} und I_M . Zur besseren Darstellung wurden die nicht geklemmten *Spikes* in der Messung des I_{NaP} in (B) eliminiert. In (C) sind die Leitfähigkeiten des unveränderten persistierenden Natrium- und M-Typ Kaliumstrom als Balkendiagramme dargestellt. Es konnte keine Veränderung der Spannungsabhängigkeit von I_M in den mutierten Tieren gefunden werden (D). Werte als Mittelwerte \pm SEM; n=12; 10.

3.6 *Knockout* des *Scn1b*-Gens hat keinen Einfluss auf I_{NaP} und I_M (*Scn1b-null-Modell*)

Spannungsabhängige Natriumkanäle bestehen aus der porenbildenden α -Untereinheit und akzessorischen β -Untereinheiten. So existieren vier Gene *Scn1b-Scn4b*, die für insgesamt fünf β -Untereinheiten ($\beta 1$, $\beta 1B$, $\beta 2$, $\beta 3$ und $\beta 4$) kodieren. Diese akzessorischen β -Untereinheiten beeinflussen das *Gating*, die Spannungsabhängigkeit und die Kinetik der α -Untereinheit und modulieren so die zelluläre Erregbarkeit. Als Teil der Immunoglobulin-Superfamilie der Zelladhäsionsmoleküle vermitteln sie u.a. Zelladhäsion und -migration (Brackenbury und Isom, 2011). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass auch die Zelloberflächenexpression von Natriumkanälen durch β -Untereinheiten beeinflusst wird. So wurde in einem Mausmodell, defizient für die $\beta 1$ -Untereinheit, in der postnatalen Entwicklung eine verminderte $Na_v1.6$ -Expression am Axoninitialsegment in zerebellären Körnerzellen gefunden (Brackenbury et al., 2010). Mit Hilfe dieses von Chen et al. (2004) beschriebenen *Scn1b*-defizienten Mausmodells sollte nun ein potenzieller regulatorischer Einfluss der akzessorischen $\beta 1$ -Untereinheit auf die Größe von I_{NaP} und I_M untersucht werden. *Scn1b-null*-Mäuse zeigen, beginnend um den 10. postnatalen Tag, eine Ataxie und spontane myoklonische Anfälle mit einer vorzeitigen Letalität um den 20. Lebenstag (Chen et al., 2004). In mehreren Studien wurde der elektrophysiologische *Scn1b-null*-Phänotyp beschrieben. In akut dissoziierten CA1-Pyramidenzellen wurden in der Größe und der Kinetik unveränderte Natriumströme gemessen (Chen et al., 2004; Uebachs et al., 2010). Es zeigten sich moderate Auswirkungen auf die Amplitude und die halbe Weite des Aktionspotenzials (Uebachs et al., 2010). In zerebellären Körnerzellen fand sich eine reduzierte Aktionspotenzial-Feuerrate und ein erniedrigter *Resurgent*-Natriumstrom (Brackenbury et al., 2010). Obwohl also schon in dissoziierten Nervenzellen gezeigt worden war, dass eine *Scn1b*-Deletion den I_{NaP} nicht beeinflusst, sollte dies noch einmal in akuten hippokampalen Hirnschnitten überprüft werden, da in dieser Präparation unter Umständen axonale Fortsätze besser erhalten bleiben. I_{NaP} und I_M wurden in 15-16 Tage alten Mäusen, homozygot für die *Scn1b*-Deletion, und in adulten Mäusen, heterozygot für die *Scn1b*-Deletion mit 50 %-Reduktion im *mRNA*-Level (s. Abb 10, E), gemessen. Weder in den juvenilen Tieren, noch in der adulten Gruppe konnte ein signifikanter Unterschied in I_{NaP} oder I_M zu den jeweiligen Kontrollgruppen gefunden werden (s. Abb. 10, A, B, C bzw. D). Die Expression der

akzessorischen $\beta 1$ -Untereinheit hat also keinen Einfluss auf die Größe des persistierenden Natrium- und des M-Typ Kaliumstroms.

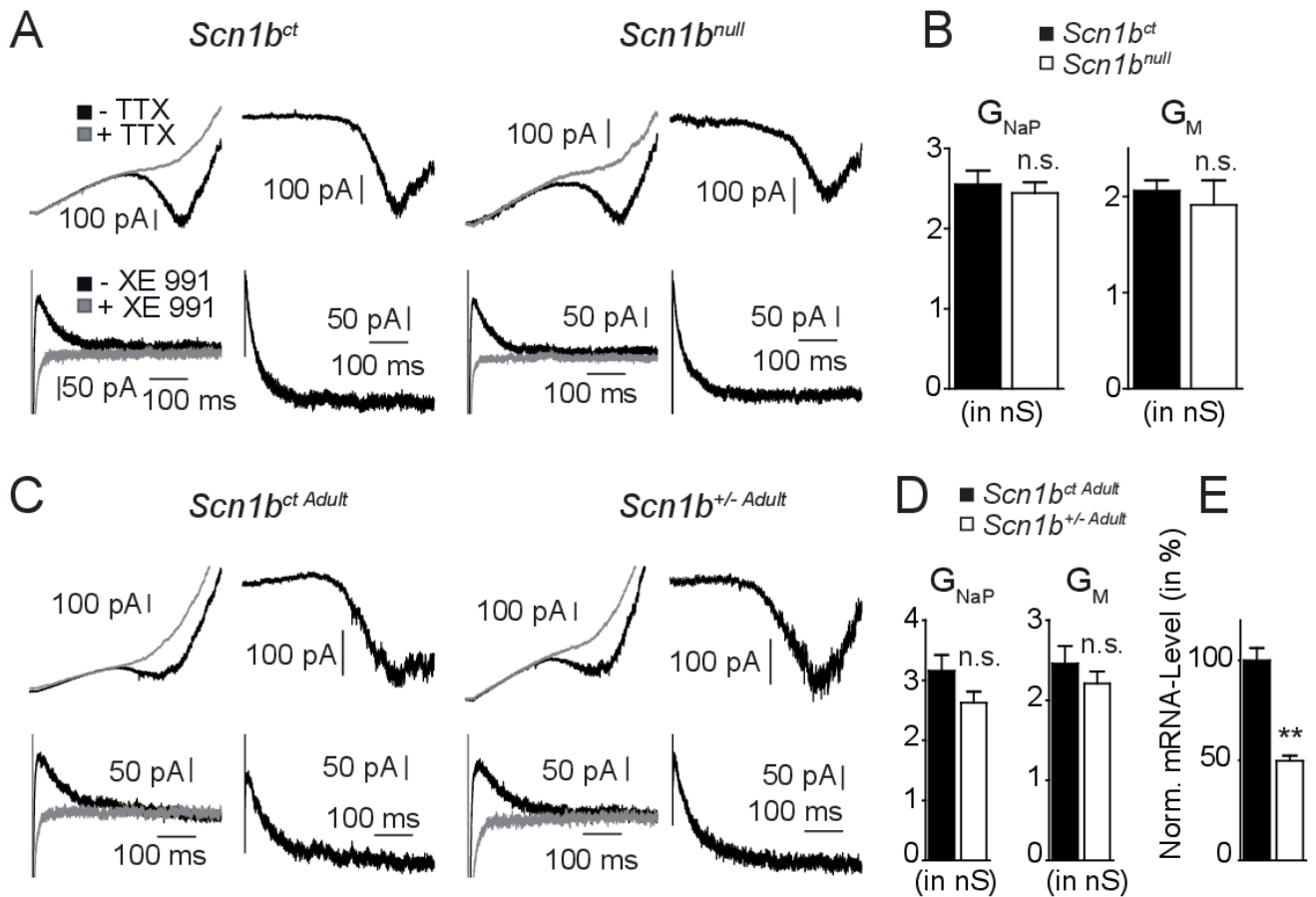


Abb. 10: Unveränderter I_{NaP} und I_M in juvenilen und adulten $\beta 1$ -Mäusen

(A) und (B) zeigen repräsentative Messungen von I_{NaP} und I_M in juvenilen Kontroll- und *Scn1b*-null-Mäusen (n=11; 10). In (C) und (D) sind die gleichen Messungen in adulten Kontroll- und *Scn1b^{+/-}*-Mäusen dargestellt (n=14; 14). In den adulten *Scn1b^{+/-}*-Tieren fand sich eine Reduktion von 50 % in der mRNA-Expression von *Scn1b* (t-Test: $p < 0,001$; n=6; 5) (E). Werte als Mittelwerte \pm SEM.

3.7 Axonale Dislokation der $K_v7.2$ -Untereinheit durch ein Ankyrin G-bindendes Peptid hat keinen Effekt auf die Größe von I_{NaP} und I_M in subikulären Pyramidenzellen (Q2-ABP-Modell)

Die Kanaluntereinheiten $Na_v1.6$ und $K_v7.2/K_v7.3$, welche überwiegend den persistierenden Natrium- bzw. den M-Typ Kaliumstrom vermitteln, sind am Axoninitialsegment lokalisiert. Hier binden sie jeweils über eine bestimmte Aminosäuresequenz, das Ankyrin G-Bindungsmotiv, an das Gerüstprotein Ankyrin G und werden so am AIS „verankert“. Dieses Bindungsmotiv befindet sich bei Natriumkanälen in der intrazellulären Schleife zwischen Segment 2 und 3, wohingegen sich ein entwicklungsgeschichtlich analoges Motiv in der C-terminalen Domäne von $K_v7.2$ und $K_v7.3$ -Untereinheiten findet (Pan et al., 2006; Cooper, 2011; Gasser et al., 2012). Shah et al. (2008) haben die Bedeutung dieser axonalen Lokalisation von K_v7 -Untereinheiten für die zelluläre Erregbarkeit untersucht. Mit Hilfe elektrophysiologischer Techniken und intrazellulärer Gabe eines Ankyrin G-Bindungspeptids (Q2-ABP), welches durch kompetitive Bindung an Ankyrin G selektiv die axonale Lokalisation von K_v7 -Untereinheiten beeinträchtigt, konnte gezeigt werden, dass eine Dissoziation der Kanäle von der axonalen Membran zu einer Depolarisation der Nervenzelle, erniedrigtem Aktionspotenzial-Schwellenwert und erhöhter Erregbarkeit mit vermehrtem Aktionspotenzial-Feuern führt. Die M-Typ Kaliumstrom-Amplitude wurde hierdurch nicht verändert. Ferner blieben die Amplitude, die halbe Breite oder die Anstiegszeit des Aktionspotenzials unverändert, was nahelegt, dass Natrium- und Kaliumkanäle, die in der Aktionspotenzial-Repolarisation involviert sind, nicht durch das Q2-ABP beeinträchtigt wurden. Um mögliche Auswirkungen einer chronischen Expression dieses Ankyrin G-Bindungspeptids und die Signifikanz einer axonalen Dislokation der K_v7 -Untereinheiten auf I_{NaP} und I_M zu untersuchen, wurde ein Mausmodell (Q2-ABP-Modell) konstruiert, in dem das Q2-ABP mit der Aminosäuresequenz YIAEGESDTD unter der Kontrolle des CaMKIIa-Promoters in neuronalen Zellen exprimiert wird. Zur Darstellung der transgenexpimirenden Zellen mittels Epifluoreszenz wurde zusätzlich das Grün-fluoreszierende Protein (GFP) an das Q2-ABP gekoppelt. Obwohl die CaMKIIa physiologisch in CA1-Pyramidenzellen exprimiert wird (Lisman et al., 2012), zeigten sich in adulten transgenen Mäusen lediglich GFP-positive subikuläre Pyramidenzellen (s. Abb. 11, C). Da aber Erkenntnisse, die die Abhängigkeit von I_{NaP}/I_M von der axonalen K_v7 -Lokalisation betreffen, durch Untersuchung von subikulären Zellen auch auf CA1-Pyramidenzellen übertragbar sein sollten, wurden nun diese Zellen mittels sequen-

ziellem I_{NaP}/I_M -Protokoll untersucht. Hierbei ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in der Größe des persistierenden Natrium- und M-Typ Kaliumstroms zwischen der Q2-ABP-exprimierenden und der Kontrollgruppe (s. Abb. 11, A und B). Zusätzlich wurde das Feuerverhalten im *Whole-cell current-clamp*-Modus gemessen. Dabei zeigte sich ein signifikant erniedrigter Membranwiderstand in der transgenen Gruppe bei unveränderter Zellkapazität (t-Test: $p < 0,01$; s. Abb. 12, B). Diese Veränderung in den passiven Eigenschaften der transgenen Gruppe war begleitet von einer moderaten, aber signifikanten Veränderung des Aktionspotenzialschwellenwertes zu positiveren Membranspannungen (t-Test: $p = 0,001$). Die Amplitude der aktiven Aktionspotenzialnachdepolarisation war zwischen beiden Gruppen nicht unterschiedlich (s. Abb. 12, A, C und D). Des Weiteren zeigte sich bei der Untersuchung des repetitiven Feuerverhaltens durch wiederholte 500 ms lange Strominjektionen eine Erniedrigung der Feuerrate (*Gain*) in den Q2-ABP^{tg}-Mäusen (s. Abb. 13 A und B). Die Adaptation der Aktionspotenzialfrequenz während der langen Strominjektion blieb hingegen unverändert (s. Abb. 13, C). Obwohl I_{NaP} und I_M unverändert bleiben, hat also die chronische Expression eines Ankyrin G-Bindungspeptids, welches K_v7 -Kanäle vom Axoninitialsegment verdrängen soll, unterschiedliche Veränderungen im Feuerverhalten zur Folge. Diese führen in der Summe zu einer verminderten Erregbarkeit subikulärer Pyramidenzellen.

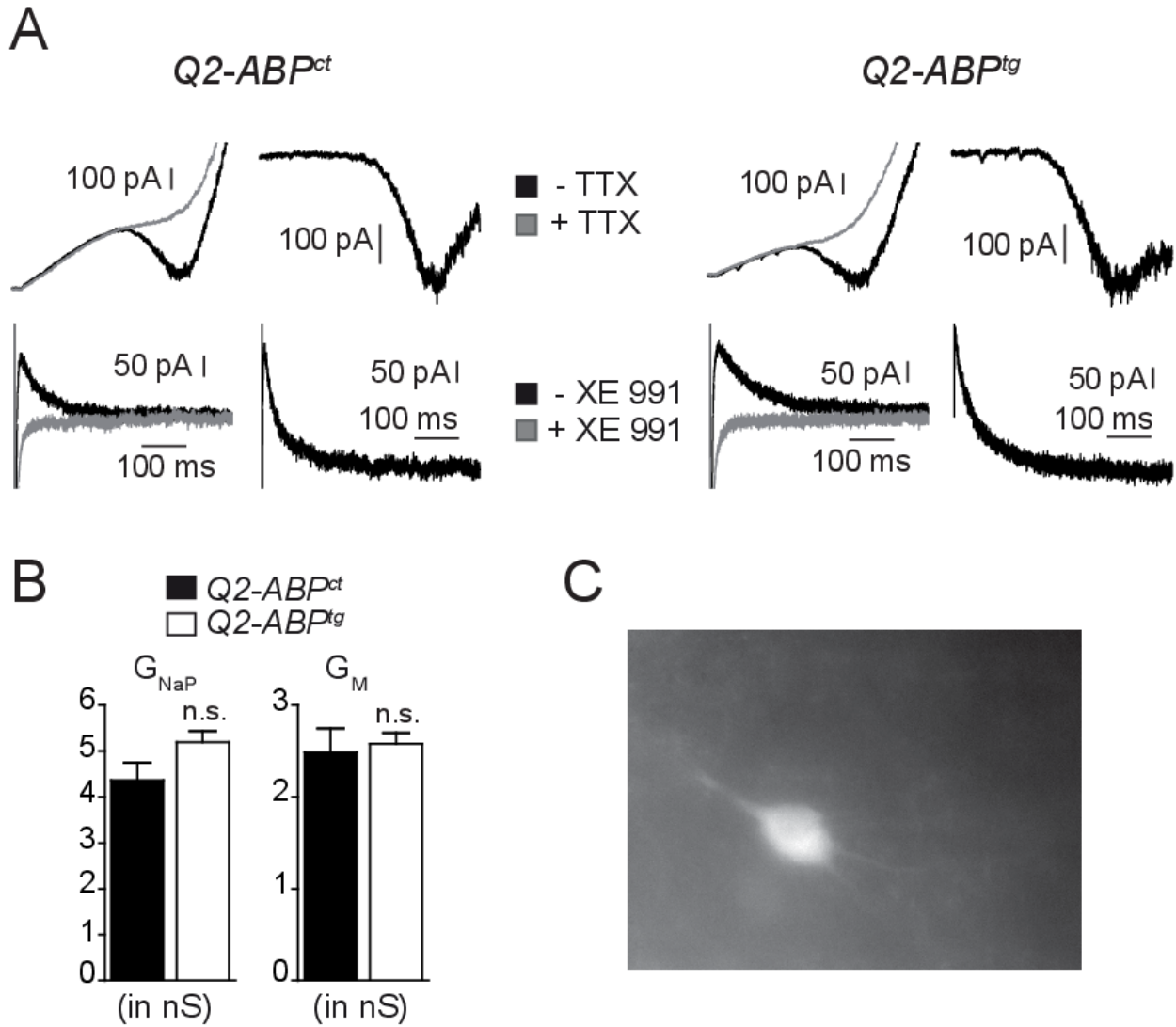


Abb. 11: Unveränderter I_{NaP} und I_M in Q2-ABP-exprimierenden Mäusen

(A) zeigt repräsentative Messungen von I_{NaP} und I_M in Kontroll- und Q2-ABP-exprimierenden Mäusen. (B) Die Leitfähigkeit von I_{NaP} und I_M blieben unverändert ($n=12$; 18). In (C) ist die Fluoreszenz einer GFP-positiven subikulären Pyramidenzelle dargestellt. Werte als Mittelwerte \pm SEM.

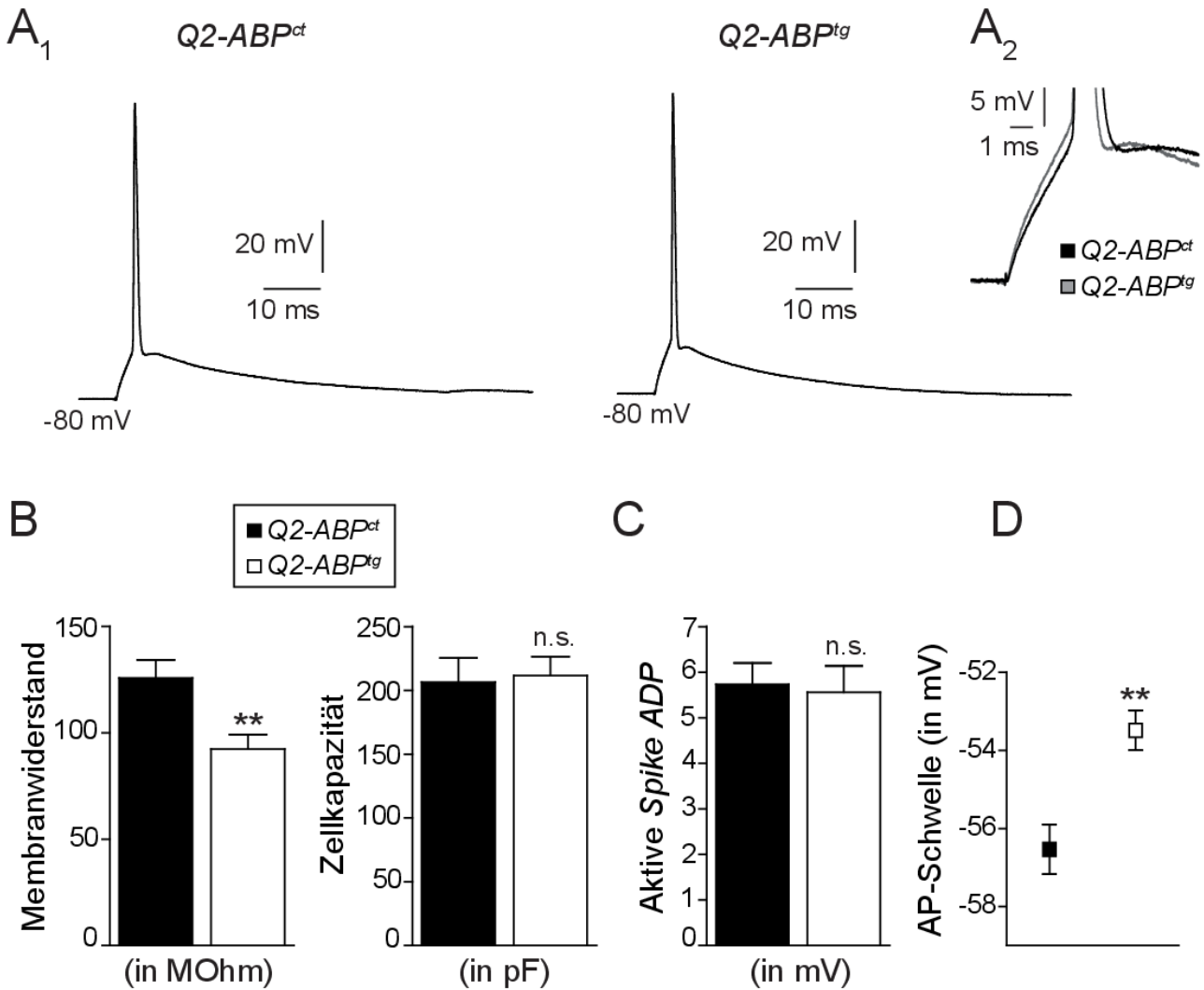


Abb. 12: Aktionspotenziale in *Q2-ABP^{ct}*- und *Q2-ABP^{tg}*-Mäusen

(A₁) zeigt repräsentative Messungen eines Aktionspotenzials in einer *Q2-ABP^{ct}*- bzw. *Q2-ABP^{tg}*-Zelle. In (A₂) sind die Aktionspotenzialschwellen der Messungen aus (A₁) vergrößert und überlagert dargestellt. Der Membranwiderstand war in der *Q2-ABP^{tg}*-Gruppe signifikant erniedrigt (t-Test: $p < 0,01$), wogegen die Zellkapazität unverändert blieb (B). In (C) ist die aktive AP-Nachdepolarisation als Balkendiagramm gezeigt. (D) zeigt die signifikant depolarisiertere AP-Schwelle in der *Q2-ABP^{tg}*-Gruppe (t-Test: $p = 0,001$). Werte als Mittelwerte \pm SEM; $n = 15$; 14.

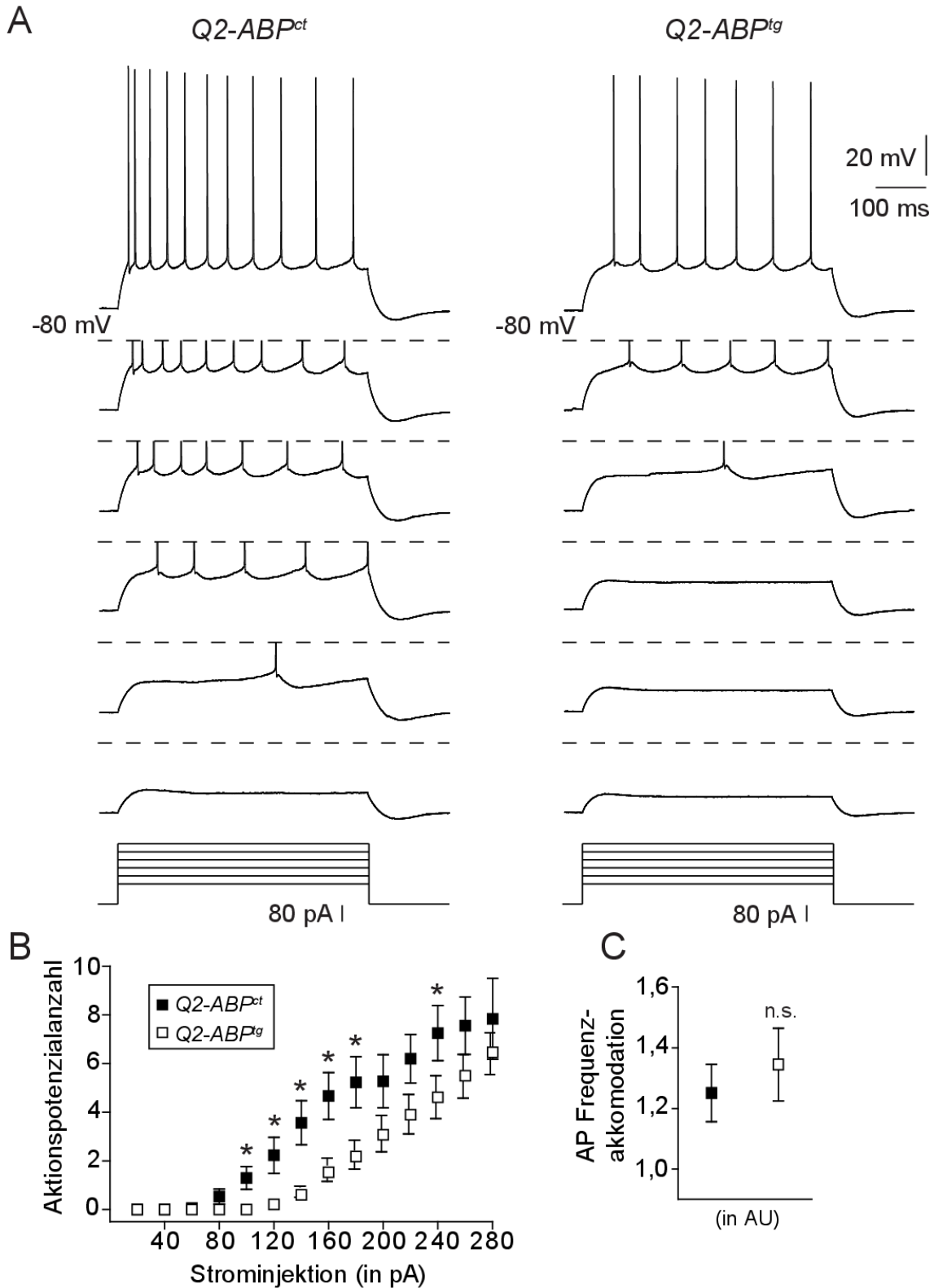


Abb. 13: Repetitives Feuerverhalten in *Q2-ABP^{ct}*- und *Q2-ABP^{tg}*-Mäusen

(A) Feuerverhalten einer repräsentativen *Q2-ABP^{ct}*- bzw. *Q2-ABP^{tg}*-Zelle, ausgelöst durch verschieden starke 500 ms lange Strominjektion. Bei diesen langen Strominjektionen fand sich eine verminderte Anzahl von Aktionspotenzialen pro Strominjektion in der *Q2-ABP^{tg}*-Gruppe (t-Test: $*=p<0,05$) (B). Die Akkommodation der Aktionspotenzialfrequenz blieb unverändert (C). Werte als Mittelwerte \pm SEM; $n=15$; 14.

Tab. 2: Es sind die passiven Zelleigenschaften (Membranwiderstand und Zellkapazität) der verwendeten Tiermodellen aufgeführt. Des Weiteren findet sich ein statistischer Vergleich dieser Eigenschaften zwischen den jeweiligen Tiergruppen.

Modell	Membranwiderstand (in MOhm) \pm SEM	t-Test	Zellkapazität (in pF) \pm SEM	t-Test
<i>Scn8a^{med}</i> (Voltage-clamp)	wt 190,7 \pm 19,95; n=9 med 230,7 \pm 22,03; n=11	p=0,2	wt 105,5 \pm 11,20; n=9 med 92,78 \pm 4,61; n= 11	p=0,27
<i>Scn8a^{med}</i> (Scharfe Mikro- elektroden)	wt 48,64 \pm 3,99; n=9 med 56,6 \pm 10,37; n=5	p=0,39	wt 168,1 \pm 19; n=9 med 155,3 \pm 16,61; n=5	p=0,67
<i>P-M2/1</i> (Voltage-clamp)	ct 170,2 \pm 10,65; n=16 tg 228,1 \pm 36,75; n=16	p = 0,04	ct 123 \pm 6,87; n=16 tg 147,5 \pm 9,15; n=16	p=0,14
<i>Kcnq2^{flox}</i> (Voltage-clamp)	ct 192,5 \pm 12,57; n=13 flox 165,6 \pm 7,28; n=13	p=0,08	ct 131,4 \pm 10,23; n=13 flox 139,9 \pm 10,73; n=13	p=0,57
<i>Kcnq2^{flox}</i> (Current-clamp)	ct 192,3 \pm 12,14; n=11 flox 208,8 \pm 21,16; n=11	p=0,51	ct 109,5 \pm 13,71; n=11 flox 125,6 \pm 12,36; n=11	p=0,39
<i>NMF134^{mut}</i> (Voltage-clamp)	-	-	ct 34,31 \pm 1,34; n=13 mut 35,42 \pm 2,4; n=12	p=0,68
<i>Scn1b juvenil</i> (Voltage-clamp)	ct 227,7 \pm 14,3; n=11 null 271,2 \pm 21,06; n=10	p=0,09	ct 103,6 \pm 4,92; n=11 null 101,3 \pm 5,92; n=10	p=0,77
<i>Scn1b adult</i> (Voltage-clamp)	ct 190,7 \pm 8,37; n=14 +/- 213 \pm 15,8; n=14	p=0,22	ct 120,2 \pm 9,65; n=14 +/- 120 \pm 8,23; n=14	p=0,98
<i>Q2-ABP</i> (Voltage-clamp)	ct 172,5 \pm 23,27; n=12 tg 131,1 \pm 9,5; n=18	p=0,07	ct 144,6 \pm 15,15; n=12 tg 144,9 \pm 7,72; n=18	p=0,99
<i>Q2-ABP</i> (Current-clamp)	ct 125,8 \pm 8,55; n=15 tg 92,42 \pm 6,84; n=14	p=0,01	ct 206,4 \pm 18,99; n=15 tg 211,6 \pm 14,95; n=14	p=0,84

4. Diskussion

4.1 Positive Korrelation von I_{NaP} und I_M in hippokampalen CA1-Pyramidenzellen

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass der persistierende Natrium- und der M-Typ Kaliumstrom in hippokampalen CA1-Pyramidenzellen zueinander positiv korrelieren. Die sequenzielle Messung wurde durch ein *Whole-cell voltage-clamp*-Protokoll ermöglicht, mit dem beide Ströme bei ausreichend guter Spannungsklemme in derselben Zelle gemessen werden konnten. Im Folgenden soll diskutiert werden, dass Korrelationen von Ionenströmen ein entscheidendes Merkmal in Nervenzellen biologischer Systeme sind und der Homöostase von Feuerverhalten dienen.

Eine Vielzahl von Studien, die sich mit dieser Thematik beschäftigen, wurde im experimentellen System des stomatogastrischen Ganglions (STG) von Krebstieren durchgeführt. Das stomatogastrische Ganglion besteht aus 25 bis 30 Neuronen, die sich in unterschiedliche Nervenzellklassen, wie zum Beispiel das *Pyloric dilator* (PD)-Neuron, unterteilen und zusammen als Rhythmusgenerator die Verdauungsmotorik im Vorderdarm koordinieren (Temporal et al., 2012). In einer frühen Studie konnten MacLean et al. (2003) im STG des Hummers *Panulirus interruptus* durch Überexpressionsexperimente zeigen, dass eine Korrelation zwischen dem transienten A-Typ Kaliumstrom (I_A) und dem durch Hyperpolarisation-aktiverbaren Einwärtsstrom (I_h) besteht. Eine Injektion von *shal-RNA* in den Zellkörper des PD-Neurons, um einen Anstieg von I_A zu induzieren, wurde durch einen gleichsinnigen Anstieg von I_h begleitet und es kam zu keiner signifikanten Änderung im Feuerverhalten. In einem weiteren Experiment konnte gezeigt werden, dass dieser Regulationsmechanismus aktivitätsunabhängig funktionierte. Nach Injektion einer mutierten, nicht funktionellen *shal-RNA*, die zu keinem I_A -Anstieg führte, kam es weiter zu einem Anstieg von I_h im PD-Neuron, welches nun ein verändertes Feuerverhalten zeigte. Die Autoren folgerten, dass zwischen beiden Strömen ein aktivitätsunabhängiger Regulationsmechanismus existieren müsse. Als möglicher Mechanismus wurde eine Ko-Translation der *RNA* beider Kanäle, zum Beispiel in *RNA*-Granula, diskutiert.

Schulz et al. (2007) untersuchten mit Hilfe von *Single-cell quantitative PCR* die Expressionsprofile von sechs verschiedenen Ionenkanal-Genen (vier Kaliumströme, ein

Natriumstrom und ein durch Hyperpolarisation-aktivierbarer Einwärtsstrom) in sechs verschiedenen Nervenzellklassen (*Pyloric dilator* (PD)-, *Lateral posterior gastric* (LPG)-, *Lateral pyloric* (LP)-, *Inferior cardiac* (IC)-, *Lateral gastric* (LG)- und *Gastric mill* (GM)-Neuron) des stomatogastrischen Ganglions. Sie verglichen die Expressionslevel (*mRNA*-Level) der einzelnen Kanal-Gene innerhalb eines Zelltyps und zwischen den Zelltypen und fanden, dass unterschiedliche Sätze korrelierender Genexpression in den einzelnen Nervenzellklassen existieren. Es zeigten sich nicht nur qualitative – die Existenz einer Korrelation betreffende –, sondern auch quantitative – die Steigung der Regressionsgeraden dieser Korrelationen betreffende – Unterschiede zwischen den einzelnen Nervenzellklassen. Die Autoren diskutierten, dass im adulten Nervensystem das Feuerverhalten der einzelnen Nervenzellklassen durch charakteristische Sätze korrelierender Ionenströme bestimmt wird. Es wurde als Mechanismus eine transkriptionale Ko-Regulation bestimmter Gene durch zelltypspezifische Mechanismen postuliert.

Über welche Mechanismen korrelierende *mRNA*- und Proteinexpression erreicht wird, ist nur zum Teil verstanden. Prinzipiell kämen verschiedene Ebenen, wie Ko-Transkription von Kanal-Genen, die Interaktion von unterschiedlichen Kanaltypen, ähnlich der Assemblierung von Kanaluntereinheiten, *Cotrafficking* von Kanälen in die Plasmamembran, oder auch Ko-Assemblierung von Ionenkanälen in Makromolekülkomplexe, in Frage (Khorkova und Golowasch, 2007; Temporal et al., 2012).

O'Leary et al. (2013) konnten in einer Arbeit mit Hilfe von computersimulierten Modellneuronen zeigen, dass Korrelationen in Ionenströmen durch homöostatische Kontrollmechanismen entstehen. Sie koppelten die Expressionsrate verschiedener Ionenkanäle an ein intrazelluläres Ca^{2+} -Signal, welches den Aktivitätssollwert widerspiegelte. Auf diese Weise entstanden, abhängig davon, wie sie die Expressionsraten der einzelnen Kanäle veränderten, unterschiedliche Ionenkanalkorrelationen. Die Autoren argumentierten, dass in ihrem Modell die verschiedenen Korrelationen im Rahmen einer homöostatischen Regulation entstehen. Unterschiedliche Regulationsdynamiken der einzelnen Ionenströme führen dabei zu Variabilität mit unterschiedlichen Korrelationen. Weiter konnte in dieser Simulation gezeigt werden, dass die gefundene homöostatische Regulation robust ist. Da Redundanz in der Funktion vieler Ionenströme existiert und

somit andere Ionenströme Abweichungen kompensieren können, konnten einzelne Ionenströme sogar abweichend vom Aktivitätssollwert „antihomöostatisch“ reguliert werden, ohne dass dies Auswirkung auf das Feuerverhalten hatte.

Es bestehen also Hinweise auf Mechanismen, die erklären, dass trotz Variabilität in der Ausstattung von Nervenzellen mit Ionenströmen ein korrektes funktionelles Verhalten durch koordinierte Regulation von Ionenströmen erreicht werden kann (Schulz et al., 2006, Ball et al., 2010). In Hinblick auf die vorliegende Studie, läge nun die Vermutung nahe, dass die gefundene Korrelation von I_{NaP} und I_M auch durch eine Ko-Regulation der Expression auf der Transkriptionsebene oder durch posttranslationale Mechanismen zustande kommt und der Homöostase dient. Dies wird durch die Bedeutung beider Ströme für das Feuerverhalten gestützt (Golomb et al., 2006). Außerdem findet sich eine Ko-Lokalisation der Kanaluntereinheiten beider Ströme am Axoninitialsegment, was über eine „einfache“ Ko-Expression hinaus weitere Möglichkeiten der Regulation eröffnen könnte. Um einen Einblick in diese vermuteten Regulationsmechanismen zu erhalten, wurden in der vorliegenden Studie beide Ströme in verschiedenen genetisch veränderten Mausmodellen untersucht. Dabei wurde jeweils einer der beiden Ströme artifiziell reduziert, um dann zu untersuchen, ob dies zu einer Änderung in der Größe des jeweils anderen führt. Zusätzlich wurde untersucht, ob akzessorische Kanaluntereinheiten und die Lokalisation am Axoninitialsegment für die Größe beider Ströme von Bedeutung sind. Die Ergebnisse sollen weiter unten diskutiert werden.

4.2 Reduktion von I_M im *Scn8a^{med}*-Modell

Es konnte in unterschiedlichen Nervenzelltypen, wie zum Beispiel zerebellären Purkinjezellen, retinalen Ganglionzellen, mesenzephalen Trigeminozellen, Nervenzellen im subthalamischen Nukleus oder hippocampalen CA1-Neuronen, gezeigt werden, dass die *med*-Mutation und andere Null-Mutationen des *Scn8a*-Gens zu einer verminderten neuronalen Erregbarkeit führen (Raman et al., 1997; Do und Bean, 2004; Wart und Matthews, 2006; Enomoto et al., 2007; Royeck et al., 2008). Diese verminderte Erregbarkeit, in CA1-Pyramidenzellen ausgelöst durch eine Reduktion des persistierenden

Natriumstroms um etwa 40 %, war in der vorliegenden Arbeit von einer Reduktion im I_M begleitet. Dieser Befund kann unterschiedlich interpretiert werden.

Einerseits könnte der Verlust der $Na_v1.6$ -Untereinheit, im Sinne einer Ko-Regulation, zu einer spezifischen Herunterregulation von I_M geführt haben. Auf der anderen Seite könnte diese Minderung im I_M durch mehrere unspezifische Mechanismen zustande gekommen sein. So könnte beispielsweise allein eine verminderte Erregbarkeit der Nervenzellen, unabhängig davon, wie diese zustande gekommen ist, zu einer Herunterregulation des I_M führen. Denkbar wäre auch, dass ein Verlust von I_{NaP} bzw. eine Untererregbarkeit der Nervenzelle eine Vielzahl von Strömen, wie zum Beispiel Kaliumströme, beeinflusst, und darunter dann eben auch den hier gemessenen M-Typ Kaliumstrom. Interessanterweise kommt verkomplizierend hinzu, dass ein kompletter Verlust der Natriumkanaluntereinheit $Na_v1.6$ nicht zu einem kompletten Verlust von I_{NaP} , sondern nur zu einer 40 % Reduktion führt. Dies zeigt zum einen, dass schon ein geringer Verlust von I_{NaP} Effekte auf den I_M hat. Andererseits ist die $Na_v1.6$ -Untereinheit also nicht die einzige Natriumkanaluntereinheit, die einen persistierenden Natriumstrom generiert, und so bleibt unklar, ob der Verlust der $Na_v1.6$ -Unterheit *per se* oder die Reduktion im I_{NaP} für die beschriebenen Effekte verantwortlich ist. Diese erste Erklärungsmöglichkeit könnte man ein stöchiometrisches Modell nennen, in dem die Nervenzelle bestrebt ist, ein gleichbleibendes Verhältnis von $Na_v1.6$ - zu K_v7 -Kanälen am AIS zu erhalten. Die andere Möglichkeit entspräche mehr einem aktivitätsabhängigem Modell, in dem ein verminderter Aktivitätswert eine Herunterregulation des M-Typ Kaliumstroms initiiert. In einem weiteren Erklärungsansatz könnten $Na_v1.6$ - und K_v7 -Untereinheiten in einem Makromolekülkomplex am AIS existieren, und der Verlust von $Na_v1.6$ könnte somit eine K_v7 -Verminderung nach sich ziehen.

Der Vergleich mit einer anderen Studie zeigt, dass ein zelltypspezifischer Kompensationsmechanismus des $Na_v1.6$ -Verlustes existiert. So untersuchten Swensen und Bean (2005) Purkinjezellen im Kleinhirn von $Na_v1.6$ -defizienten (*Scn8a^{med}*) Mäusen. Sie fanden, dass sich das *Bursting*-Feuerverhalten von $Na_v1.6$ -defizienten Mäusen nur wenig von dem der Kontrolltiere unterschied und dass hierfür eine kompensatorische Hochregulation von T- und P-Typ Kalziumströmen bei verminderten I_{NaP} verantwortlich ist. Ein solcher Kompensationsmechanismus konnte in CA1-Pyramidenzellen des

Hippokampus nicht gefunden werden. Royeck et al. (2008) konnten keinen Unterschied im T-Typ Kalziumstrom zwischen $\text{Na}_v1.6$ -defizienten und Kontrolltieren finden. Wie die vorliegende Arbeit zeigen konnte, führt ein $\text{Na}_v1.6$ -Verlust in CA1-Pyramidenzellen demgegenüber zu einer M-Typ Kaliumstromreduktion. Somit lässt sich auch argumentieren, dass eben keine, wie oben erwähnt, unspezifische Kompensationen als Konsequenz des $\text{Na}_v1.6$ -Verlustes stattfinden. Es existieren vielmehr zelltypspezifische Kompensationsmechanismen, welche in Purkinjezellen über eine Hochregulation von Einwärtsströmen und in CA1-Pyramidenzellen über eine Herunterregulation von Auswärtsströmen Aspekte des Feuerverhaltens konstant halten. Im Einklang hierzu fand eine weitere Studie, dass ein $\text{Na}_v1.6$ -Verlust in der *med^{Tg}-Scn8a*-Mauslinie in retinalen Ganglienzellen durch eine Hochregulation von $\text{Na}_v1.1$ - und $\text{Na}_v1.2$ -Untereinheiten in Axoninitialsegmenten und Ranvierschen Schnürringen kompensiert wird. Hingegen fand sich in derselben Mauslinie im Axoninitialsegment von Purkinjezellen des Kleinhirns lediglich eine Hochregulation von $\text{Na}_v1.1$ -Untereinheiten, und im zerebralen Kortex und im Hippokampus konnten die Autoren in Immunfluoreszenz-Färbungen eine Hochregulation von $\text{Na}_v1.2$ -, nicht aber von $\text{Na}_v1.1$ -Untereinheiten entdecken (Wart und Matthews, 2006).

Die Reduktion von I_M in CA1-Pyramidenzellen scheint nicht auf Transkriptionsebene stattzufinden, da sich die Expression von K_v7 -Untereinheiten auf *mRNA*-Ebene zwischen beiden Tiergruppen nicht unterschied. Wie oben bereits erwähnt, existiert posttranskriptional eine Vielzahl von Mechanismen, die zu einer Stromreduktion führen könnten. Um weiter zu untersuchen, ob es überhaupt zu einer Reduktion der K_v7 -Untereinheiten am Axoninitialsegment kommt oder ob Modifikationen der Kanalproteine, wie zum Beispiel durch Phosphorylierung, für die Stromreduktion verantwortlich sind, wären semiquantitative immunhistochemische Färbungen nötig.

Der Befund, dass $\text{Na}_v1.6$ -Verlust und M-Typ Kaliumströme miteinander verknüpft sind, ist unabhängig von der Kenntnis der genaueren Mechanismen interessant. So ist das Axoninitialsegment in der juvenilen Entwicklung einem vielseitigen Umbau unterlegen. Sowohl die Natriumkanaluntereinheit $\text{Na}_v1.6$ als auch die K_v7 -Untereinheiten werden postnatal hochreguliert. So konnte gezeigt werden, dass das *Scn8a*-Transkript postnatal ansteigt (García et al., 1998; Boiko et al., 2001; Wart und Matthews, 2006a; Liao et al.,

2010). Ein vergleichbarer Anstieg findet sich im Hippokampus in der Immunreaktivität von $K_v7.2$ - und $K_v7.3$ -Untereinheiten in den ersten drei Wochen postnatal (Weber et al., 2006; Geiger et al., 2006). Es scheint also möglich, dass für eine reibungslose neuronale Funktion und postnatale Entwicklung das Verhältnis dieser beiden Ströme entscheidend ist. Verringerungen um 25 % im M-Typ Kaliumstrom sind dabei in dieser kritischen postnatalen Episoden schon ausreichend, um neonatale Epilepsieformen, wie die *Benign familial neonatal convulsions*, auszulösen (Schroeder et al., 1998).

4.3 I_{NaP} in den verschiedenen Mausmodellen zur I_M -Reduktion (*P-M2/1*-Modell, *Kcnq2^{flox}*-Modell, *NMF134^{mut}*-Modell)

Die Diskussion soll sich im Folgenden auf das *P-M2/1*- und das *Kcnq2^{flox}*-Modell konzentrieren. Das *NMF134^{mut}*-Modell, in welchem keine I_M -Reduktion gefunden werden konnte, soll nicht weiter besprochen werden.

Es wurde in dieser Studie angenommen, dass ein wesentlicher Unterschied im *P-M2/1*- und im *KCNQ2^{flox}*-Modell in der Anzahl der $K_v7.2$ -Kanäle am Axoninitialsegment besteht. Im *KCNQ2^{flox}*-Modell sollte deren Anzahl durch Genverlust reduziert sein, im *P-M2/1*-Modell sollte hingegen deren Anzahl unverändert sein, da die dominant-negativen $K_v7.2$ -Untereinheiten unverändert zum Axoninitialsegment transportiert werden sollten. Allerdings wurden in der vorliegenden Arbeit keine immunhistochemischen Färbungen durchgeführt, um diese Hypothese zu überprüfen.

Nach dieser einschränkenden Vorbemerkung ist festzustellen, dass weder im *P-M2/1*- noch im *Kcnq2^{flox}*-Modell bei reduziertem I_M eine Reduktion im I_{NaP} gefunden werden konnte. Im *Kcnq2^{flox}*-Modell fand sich sogar eine Vergrößerung des I_{NaP} . Diese Befunde scheinen gegen die Hypothese einer aktivitätsabhängigen Homöostase zu sprechen. Allerdings bestünde die Möglichkeit, dass I_{NaP} nicht in dem Maße wie I_M aktivitätsabhängig reguliert wird. Es wäre auch zu erwägen, dass nur eine Veränderung in der $Na_v1.6$ -Untereinheit bzw. im I_{NaP} als dominantes Element in der Verbindung dieser Ströme eine Veränderung im I_M nach sich zieht, wogegen eine Reduktion im I_M wie in den genannten Modellen keine Reduktion im I_{NaP} verursacht. Es würde sich dann um eine unidirektionale Ko-Regulation dieser Ströme handeln. Im *Kcnq2^{flox}*-Modell bei

verminderten $K_v7.2$ -Untereinheiten fand sich sogar eine Vergrößerung des I_{NaP} , was gegebenenfalls durch ein vermehrtes „Platzangebot“ an Bindungsstellen für $Na_v1.6$ -Untereinheiten am AIS zu erklären wäre. Dieser Erklärungsansatz würde zu einer weiteren Hypothese führen, die man als „Verfügbarkeits“-Hypothese bezeichnen könnte. Um Klarheit darüber zu erlangen, ob es im $Kcnq2^{flox}$ -Modell zu einer Änderung in der Anzahl von $Nav1.6$ -Kanälen oder „lediglich“ zu einer Vergrößerung von I_{NaP} durch Kanalmodifikationen kommt, bedürfte es weiterer Untersuchungen mit anderen Methoden wie Immunhistochemie und Expressionsuntersuchungen.

Die Hochregulation des persistierenden Natriumstroms im $Kcnq2^{flox}$ -Modell könnte aber auch durch andere plastische Vorgänge zustande kommen, welche sich auch im Pilocarpin-Modell der Temporallappenepilepsie finden. In diesem Epilepsiemodell kommt es nach einem pharmakologisch induzierten *Status epilepticus* zu plastischen Vorgängen, die letztlich zu einer chronischen Epilepsie mit Ammonshornsklerose führen. In diesem Modell konnte neben anderen plastischen Veränderungen auch eine Hochregulation von I_{NaP} gefunden werden (Chen et al., 2011). So könnten also durch den verminderten M-Typ Kaliumstrom im $Kcnq2^{flox}$ -Modell epilepsietypische plastische Vorgänge angestoßen werden. Die Hochregulation des I_{NaP} entspräche dann einem frühen Stadium in der Entwicklung einer Epilepsie, da die vermehrte Erregbarkeit sich in dieser Tiergruppe oft nur durch abnormales Verhalten mit auffälligem Elektrokortikogramm und nicht durch schwerwiegende epileptische Anfälle äußert.

4.4 Verlust der akzessorischen $\beta 1$ -Kanaluntereinheit und dessen Auswirkungen auf I_{NaP} und I_M (*Scn1b*-Modell)

Wie oben erwähnt, bestehen Natriumkanäle zusätzlich zu den porenformenden, Ionenleitenden α -Untereinheiten aus weiteren akzessorischen β -Untereinheiten, die unterschiedliche Aufgaben wie Modulation der Spannungsabhängigkeit und Kinetik der Kanalöffnung übernehmen. Den $\beta 1$ -Untereinheiten werden als Teil der Immunglobulin-Superfamilie der Zelladhäsionsmoleküle noch darüber hinausgehende Aufgaben zugeschrieben. Für eine ausführliche Übersicht siehe Brackenbury und Isom (2011). In der vorliegenden Arbeit wurde ein Mausmodell verwendet, welches homozygot-defizient für die akzessorische $\beta 1$ -Untereinheit ist. Hierdurch sollte untersucht werden, ob dieses

Molekül, dem in vorangegangenen Studien so viele unterschiedliche Funktionen zugeschrieben werden konnten, auch eine Funktion in der Regulation von I_{NaP} und I_M übernimmt. Funktionell sind $\beta 1$ -homozygot-defiziente Mäuse ataktisch und zeigen spontane generalisierte Anfälle und eine verfrühte Letalität (Chen et al., 2004). Die Veränderung der Erregbarkeit wird von einem morphologischen Korrelat begleitet. Dieses spiegelt sich in einer Modifikation der Anatomie in unterschiedlichen Regionen des Gehirns wie dem kortikospinalen Trakt, dem Kleinhirn und dem Hippokampus wider. Des Weiteren finden sich Veränderungen in der Lokalisation von Axonen, der Ausrichtung von Nervenzellen und in der Proliferation und Migration von Vorläuferzellen (Brackenbury et al., 2008; Brackenbury et al., 2013).

In einer früheren Arbeit konnte gezeigt werden, dass ein Verlust der $\beta 1$ -Untereinheit zu einem Verlust der $Na_v1.6$ -Untereinheit in Körnerzellen und Purkinjezellen des Kleinhirns führt. Die Autoren diskutierten, dass zwischen $\beta 1$ und $Na_v1.6$ eine reziproke Beziehung herrscht, sie in einer Art Makromolekülkomplex agieren und diese Interaktion speziell in der postnatalen Entwicklung für die Lokalisation von $Na_v1.6$ am AIS und dem Neuritenwachstum von Bedeutung ist (Brackenbury et al., 2010). Ob dies allerdings auch für hippocampale CA1-Pyramidenzellen gilt, konnte bisher noch nicht gezeigt werden. So konnte in einer früheren Arbeit derselben Arbeitsgruppe keine Reduktion der $Na_v1.6$ -Untereinheit in CA1-Pyramidenzellen des Hippokampus und an Ranvierschen Schnürringen des N. opticus in $\beta 1$ -defizienten Mäusen gefunden werden (Chen et al., 2004). Es zeigten sich vielmehr Veränderungen in der Expression von $Na_v1.1$ und $Na_v1.3$. Eine andere Studie, die ein Mausmodell mit punktmutierter C121W- $\beta 1$ -Form benutzte, um eine genetische Epilepsieform mit febrilen Anfällen zu untersuchen, fand einen Verlust dieser $\beta 1$ -Untereinheit am Axoninitialsegment von CA1-Pyramidenzellen. Auch hier konnten in immunhistochemischen Färbungen gegen verschiedene Natriumkanaluntereinheiten keine Verminderungen von Natriumkanälen am AIS gefunden werden (Wimmer et al., 2010).

Diese Unterschiede zwischen den einzelnen Studien lassen sich gegebenenfalls durch die unterschiedlichen Tiermodelle oder durch Unterschiede im Transport von $Na_v1.6$ -Untereinheiten und unterschiedliche Kompensationsmechanismen in den verschiedenen

Zelltypen erklären. Ebenso ist es denkbar, dass Unterschiede in den Immunhistochemie-Protokollen für diese sich widersprechenden Ergebnisse verantwortlich sind.

Ein Einfluss der $\beta 1$ -Untereinheit auf I_{NaP} und I_M konnte in der vorliegenden Arbeit nicht gefunden werden. Hinsichtlich des persistierenden Natriumstroms bestätigte dieses Ergebnis frühere Arbeiten an dissoziierten Nervenzellen (Chen et al., 2004; Uebachs et al., 2010; Brackenbury et al., 2010). Allerdings lassen sich auch diese Ergebnisse der elektrophysiologischen I_{NaP}/I_M -Messung ohne ergänzende immunhistochemische Untersuchung hinsichtlich der Frage eines $Na_v1.6$ -Untereinheitenverlustes am AIS in CA1-Pyramidenzellen nicht zufriedenstellend interpretieren. Sicher scheint, dass ein $\beta 1$ -Untereinheitenverlust auch in Messungen von intakten CA1-Pyramidenzellen in akuten Hirnschnitten zu keiner Veränderung des persistierenden Natriumstroms führt. Es bleibt vorerst unklar, ob dieser persistierende Natriumstrom weiter mit Hilfe von $Na_v1.6$ -Untereinheiten generiert wird. Falls in *Scn1b-null*-Mäusen keine oder weniger $Na_v1.6$ -Untereinheiten am AIS von CA1-Pyramidenzellen lokalisiert sind, müssten andere und in ihrer Kinetik veränderte Natriumkanaluntereinheiten vermehrt I_{NaP} erzeugen. Auch für den unveränderten M-Typ Kaliumstrom lassen sich mehrere, bereits weiter oben genannte Erklärungsansätze finden, die sich mit einer $Na_v1.6$ -spezifischen immunhistochemischen Färbung weiter überprüfen ließen. So könnte I_M unverändert bleiben, da die $Na_v1.6$ -Untereinheiten in ihrer Anzahl unverändert sind (Stöchiometrisches Modell) oder, einen $Na_v1.6$ -Verlust vorausgesetzt, weil der persistierende Natriumstrom unverändert ist (Aktivitätsabhängiges Modell).

4.5 Bedeutung der axonalen Lokalisation der $K_v7.2$ -Untereinheit für I_{NaP} und I_M (Q2-ABP-Modell)

Mit dem Q2-ABP-Modell sollte der Einfluss einer chronischen Verdrängung (Dislokation) der K_v7 -Kanäle durch ein Ankyrin-bindendes Peptid (Q2-ABP) auf den persistierenden Natriumstrom, den M-Typ Kaliumstrom und schließlich auch auf das Feuerverhalten untersucht werden. Wie oben bereits erwähnt, fand die Untersuchung wegen eines subikulären Expressionsmusters des Transgens in subikulären Pyramidenzellen statt. Shah et al. (2008) haben bereits in einer früheren Arbeit den Einfluss einer akuten Dislokation von K_v7 -Untereinheiten auf das Feuerverhalten in CA1-Pyramidenzellen unter-

sucht. Hierbei zeigte sich, dass eine Dissoziation der Kanäle von der axonalen Membran zu einer Depolarisation der Nervenzelle, einem erniedrigten Aktionspotenzial-Schwellenwert und einer erhöhten Erregbarkeit mit vermehrtem Aktionspotenzial-Feuern führt. Die somatisch gemessene M-Typ Kaliumstrom-Amplitude wurde nicht beeinflusst. Ferner zeigten sich die Amplitude, die halbe Breite oder die Anstiegszeit des Aktionspotenzials unverändert. Dies wurde von den Autoren als Hinweis gewertet, dass Natrium- und Kaliumströme, die in der Aktionspotenzial-Repolarisation involviert sind, durch das Q2-ABP nicht beeinträchtigt wurden.

Vorausgesetzt, dass sich subikuläre Pyramidenzellen wie CA1-Pyramidenzellen hinsichtlich der Regulation von I_{NaP} und I_M verhalten, konnten in der vorliegenden Studie folgende Unterschiede zu Shah et al. (2008) gefunden werden. Es zeigte sich, dass bei chronischer transgener Expression des Q2-ABP, im Unterschied zu einer akuten, die Nervenzellen eher weniger erregbar waren. Der persistierende Natrium- und M-Typ Kaliumstrom zeigten keine Unterschiede zwischen der transgenen und der Kontrollgruppe. Dies wurde auch von Shah et al. (2008) hinsichtlich des M-Typ Kaliumstroms berichtet, wohingegen der persistierende Natriumstrom nicht untersucht wurde. Allerdings zeigte sich ein signifikant erniedrigter Membranwiderstand in der transgenen Gruppe; dieser war bei Shah et al. (2008) erhöht. Das Ruhemembranpotenzial war im Gegensatz zu Shah et al. (2008), wo es depolarisierter war, unverändert. Diese Veränderung in den passiven Eigenschaften der transgenen Gruppe waren begleitet von einer moderaten, aber signifikanten Veränderung des Aktionspotenzialschwellenwertes zu positiveren Membranspannungen, dieses war bei Shah et al. (2008) erniedrigt. Die Amplitude der aktiven Aktionspotenzialnachdepolarisation war wie bei Shah et al. (2008) zwischen beiden Gruppen nicht unterschiedlich. Des Weiteren zeigte sich bei der Untersuchung des repetitiven Feuerverhaltens durch wiederholte 500 ms lange Strominjektionen eine Erniedrigung der Feuerrate (*Gain*) in den *Q2-ABP^{tg}*-Mäusen, wohingegen die Nervenzellen bei Shah et al. (2008) vermehrt feuerten.

Obwohl also I_{NaP} und I_M unverändert blieben, hatte die chronische Expression eines Ankyrin G-Bindungspeptids, welches K_v7 -Kanäle vom Axoninitialsegment verdrängen soll, im Gegensatz zur akuten Applikation mit Hilfe einer *Patch clamp*-Pipette eine Verminderung der zellulären Erregbarkeit zur Folge. Diese Unterschiede zwischen Shah

et al. (2008) und der hier vorliegenden Studie lassen sich möglicherweise durch die unterschiedlichen untersuchten Zelltypen erklären. Andererseits könnte eine chronische Applikation des Peptids auch Kompensationsmechanismen auslösen, die zur Abnahme der Erregbarkeit führen. Zuletzt besteht die Möglichkeit, dass die längere Überproduktion des Transgens auch zu einer unspezifischen Verdrängung von Natriumkanälen führt, die ein sich von den K_v7 -Untereinheiten nur in wenigen Aminosäuren unterscheidendes analoges Ankyrin G-Bindungsmotiv besitzen (Cooper, 2011). Auch hier ließe sich mit immunhistochemischen Färbungen gegebenenfalls mehr Klarheit bezüglich der Mechanismen schaffen.

Interessanterweise ließ sich bei Shah et al. (2008) trotz elektrophysiologischen Phänotyps die postulierte Verdrängung von $K_v7.2$ und $K_v7.3$ -Untereinheiten durch das Q2-ABP vom Axoninitialsegment nicht in immunhistochemischen Färbungen darstellen. Die Autoren diskutierten, dass dies möglicherweise an einer eingeschränkten Diffusionskapazität von Kanälen am dichtgepackten Axoninitialsegment liegen könnte. Weiter könnte das Q2-ABP eine lokale Reorganisation der Kanäle von der Membran nach intrazellulär induzieren. Dies ließe sich in Antikörperfärbungen nicht darstellen, da erstens nur Antikörper gegen intrazelluläre Domänen verwendet wurden und außerdem der schmale Durchmesser des AIS ($\sim 1 \mu\text{m}$) die Differenzierung mittels konfokaler Mikroskopie zwischen zytoplasmatischer und Membranfluoreszenz erschwert.

4.6 Ausblick

Die vorliegende Studie konnte eine Korrelation zwischen dem persistierenden Natriumstrom und dem M-Typ Kaliumstrom finden. Solche Korrelationen zwischen Ionenströmen sind zellspezifisch und dienen der Homöostase. Es wäre sicherlich interessant, weiter zu untersuchen, ob eine Korrelation zwischen I_{NaP} und I_M auch in anderen Zelltypen des Nervensystems zu finden ist. Untersuchungen wären insbesondere in Zelltypen lehrreich, welche ein von CA1-Pyramidenzellen abweichendes Feuerverhalten zeigen. Dieses findet sich zum Beispiel in subikulären Neuronen des Hippokampus. In dieser Region finden sich vermehrt Zellen, welche ein *Bursting*-Feuerverhalten zeigen (Jarsky, 2008). In diesen Zellen ließe sich gegebenenfalls keine Korrelation finden. Es

wäre aber auch denkbar, dass sich in diesen Zellen lediglich die Steigung der Regressionsgerade der I_{NaP}/I_M -Korrelation unterscheidet. Beispielsweise konnte bei der Untersuchung von Nervenzellen im Atemzentrum des Hirnstamms gezeigt werden, dass in Schrittmacherneuronen, die ein *Bursting*-Feuerverhalten zeigen, das Verhältnis von I_{NaP} gegenüber spannungsunabhängigen Kaliumströmen (I_{Leak}) größer ist als bei regulär feuernenden Nervenzellen (Negro et al., 2002).

Weiter konnte in der vorliegenden Arbeit ein Regulationsmechanismus zwischen dem persistierenden Natriumstrom und dem M-Typ Kaliumstrom gezeigt werden. Dieser Mechanismus zwischen beiden Strömen funktionierte lediglich unidirektional, da M-Typ Kaliumstromreduktionen in verschiedenen Mausmodellen keine Reduktion des persistierenden Natriumstroms verursachten. Solche unidirektionale Regulationsmechanismen könnten dazu führen, dass manche Kanalmutationen wie zum Beispiel in K_v7 -Kanälen nicht kompensiert werden können und zu Erkrankungen, wie der *Benign Familial Neonatal Convulsions* führen (Jentsch, 2000).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit geben erste Einblicke in mögliche Ko-Regulationsmechanismen von Ionenströmen. Für ein besseres Verständnis von zahlreichen pathophysiologischen Zuständen, wie epileptischen oder psychiatrischen Erkrankungen (Trasande und Ramirez, 2007; Beck und Yaari, 2008; Ramocki und Zoghbi, 2008; Fröhlich et al., 2008), ist eine eingehendere Kenntnis der physiologischen Ionenkanalregulationen notwendig.

5. Zusammenfassung

Der Fokus der vorliegenden Arbeit liegt auf der Untersuchung homöostatischer Regulationsmechanismen zwischen dem persistierenden Natrium (I_{NaP})- und dem M-Typ Kaliumstrom (I_M) in CA1-Pyramidenzellen des Hippokampus. Diese Ströme sind unter anderem für die korrekte Größe der Aktionspotenzialnachdepolarisation der Nervenzelle von entscheidender Bedeutung und beeinflussen damit direkt ihr Feuerverhalten. Die sie vermittelnden Natrium- und Kaliumkanaluntereinheiten ($Na_v1.6$ bzw. K_v7) sind am Axon-initialsegment (AIS) ko-lokalisiert. Dies führte zu der Hypothese, dass beide Ströme homöostatisch ko-reguliert werden sollten, um über längere Zeiträume ein stabiles Feuerverhalten zu gewährleisten. Eine Verminderung oder Vergrößerung einer dieser Ströme sollte dann zu einer gleichsinnigen Änderung des jeweiligen anderen führen.

In sequenziellen Messungen beider Ströme in derselben Zelle mittels der *Whole-cell voltage-clamp*-Technik konnte eine Korrelation beider Ströme gefunden werden. Zur weiteren Untersuchung einer potenziellen Ko-Regulation wurden genetisch veränderte Mausmodelle benutzt, welche durch unterschiedliche Verfahrensweisen chronisch reduzierte persistierende Natrium- bzw. M-Typ Kaliumströme besaßen. Hier zeigte sich in einem Modell mit chronisch reduziertem I_{NaP} durch Verlust der $Na_v1.6$ -Untereinheit eine Reduktion im I_M . Diese Reduktion kam durch posttranskriptionale Mechanismen zustande, da sich die *mRNA*-Level der K_v7 -Untereinheiten unverändert zeigten. Demgegenüber führte eine Reduktion des I_M nicht zu einer Verminderung des I_{NaP} . In einem Modell der I_M -Reduktion fand sich sogar ein vergrößerter persistierender Natriumstrom. Es bestand also eine unidirektionale Ko-Regulation beider Ströme. Weiter hatte der Verlust einer akzessorischen Natriumkanaluntereinheit ($\beta 1$) und die Dislokation der K_v7 -Untereinheiten vom AIS durch ein Ankyrin G-Bindungspeptid keinen Einfluss auf die Größe beider Ströme.

Die Ergebnisse dieser Studie geben erste Einblicke in mögliche Ko-Regulationsmechanismen von Ionenströmen. Die Kenntnis physiologischer Ionenkanalregulationen ist für ein besseres Verständnis der pathophysiologischen Mechanismen von ZNS-Erkrankungen wie zum Beispiel Epilepsie notwendig.

6. Abbildungsverzeichnis und Tabellenverzeichnis

Abb. 1:	Sequenzielle Messung von I_{NaP} und I_M in derselben CA1-Pyramidenzelle	31
Abb. 2:	Immunhistologie von $Na_v1.6$ und $K_v7.2$ in CA1	32
Abb. 3:	Sequenzielle I_{NaP}/I_M -Messung und Feuerverhalten in $Scn8a^{med}$ -Mäusen	35
Abb. 4:	<i>mRNA</i> -Expressionslevel in $Scn8a^{wt}$ - und $Scn8a^{med}$ -Tieren	36
Abb. 5:	Unveränderter I_{NaP} bei chronischer I_M -Reduktion durch eine dominant-negative $K_v7.2$ -Untereinheit	39
Abb. 6:	Ergebnisse der <i>Quantitative real-time RT-PCR</i> der CA1-Region in $P-M2/1^{ct}$ - und $P-M2/1^{tg}$ - Mäusen	40
Abb. 7:	Vergrößerter I_{NaP} bei chronischer I_M -Reduktion durch $Kcnq2$ -Deletion ($Kcnq2^{flox}$ -Modell)	42
Abb. 8:	Feuerverhalten in $Kcnq2^{ct}$ - und $Kcnq2^{flox}$ -Tieren	43
Abb. 9:	Unveränderter I_{NaP} im $NMF134^{mut}$ -Modell	45
Abb. 10:	Unveränderter I_{NaP} und I_M in juvenilen und adulten $\beta 1$ -Mäusen	47
Abb. 11:	Unveränderter I_{NaP} und I_M in Q2-ABP-exprimierenden Mäusen	50
Abb. 12:	Aktionspotenziale in $Q2-ABP^{ct}$ - und $Q2-ABP^{tg}$ -Mäusen	51
Abb. 13:	Repetitives Feuerverhalten in $Q2-ABP^{ct}$ - und $Q2-ABP^{tg}$ -Mäusen	52
Tab. 1:	<i>Primer</i> -Sequenzen für die <i>RT-PCR</i>	27
Tab. 2:	Passive Zelleigenschaften in den verwendeten Tiermodellen	53

7. Literaturverzeichnis

Agrawal N, Hamam BN, Magistretti J, Alonso A, Ragsdale DS. Persistent sodium channel activity mediates subthreshold membrane potential oscillations and low-threshold spikes in rat entorhinal cortex layer V neurons. *Neuroscience* 2001; 102: 53-64

Alonso A, Llinás RR. Subthreshold Na⁺-dependent theta-like rhythmicity in stellate cells of entorhinal cortex layer II. *Nature* 1989; 342: 175-177

Aman TK, Grieco-Calub TM, Chen C, Rusconi R, Slat EA, Isom LL, Raman IM. Regulation of persistent Na current by interactions between beta subunits of voltage-gated Na channels. *J Neurosci* 2009; 29: 2027-2042

Amitai Y. Membrane potential oscillations underlying firing patterns in neocortical neurons. *Neuroscience* 1994; 63: 151-161

Baker MD, Bostock H. Low-threshold, persistent sodium current in rat large dorsal root ganglion neurons in culture. *J Neurophysiol* 1997; 77: 1503-1513

Ball JM, Franklin CC, Tobin AE, Schulz DJ, Nair SS. Coregulation of ion channel conductances preserves output in a computational model of a crustacean cardiac motor neuron. *J Neurosci* 2010; 30: 8637-8649

Bant JS, Raman IM. Control of transient, resurgent, and persistent current by open-channel block by Na channel beta4 in cultured cerebellar granule neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107: 12357-12362

Beck H, Yaari Y. Plasticity of intrinsic neuronal properties in CNS disorders. *Nat Rev Neurosci* 2008; 9: 357-369

Bergquist S, Dickman DK, Davis GW. A hierarchy of cell intrinsic and target-derived homeostatic signaling. *Neuron* 2010; 66: 220-234

Boiko T, Rasband MN, Levinson SR, Caldwell JH, Mandel G, Trimmer JS, Matthews G. Compact myelin dictates the differential targeting of two sodium channel isoforms in the same axon. *Neuron* 2001; 30: 91-104

Brackenbury WJ, Davis TH, Chen C, Slat EA, Detrow MJ, Dickendesher TL, Ranscht B, Isom LL. Voltage-gated Na⁺ channel beta1 subunit-mediated neurite outgrowth requires Fyn kinase and contributes to postnatal CNS development in vivo. *J Neurosci* 2008; 28: 3246-3256

Brackenbury WJ, Calhoun JD, Chen C, Miyazaki H, Nukina N, Oyama F, Ranscht B, Isom LL. Functional reciprocity between Na⁺ channel Nav1.6 and beta1 subunits in the coordinated regulation of excitability and neurite outgrowth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107: 2283-2288

Brackenbury WJ, Isom LL. Na Channel β Subunits: Overachievers of the Ion Channel Family. *Front Pharmacol* 2011; 2: 53

Brackenbury WJ, Yuan Y, O'Malley HA, Parent JM, Isom LL. Abnormal neuronal patterning occurs during early postnatal brain development of Scn1b-null mice and precedes hyperexcitability. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; 110: 1089-1094

Brown DA, Adams PR. Muscarinic suppression of a novel voltage-sensitive K⁺ current in a vertebrate neuron. *Nature* 1980; 283: 673-676

Burgess DL, Kohrman DC, Galt J, Plummer NW, Jones JM, Spear B, Meisler MH. Mutation of a new sodium channel gene, Scn8a, in the mouse mutant 'motor endplate disease'. *Nat Genet* 1995; 10: 461-465

Cannon WB. Physiological regulation of normal states: some tentative postulates concerning biological homeostatics. In: Pettit A ed. A Charles Richet: ses amis, ses collègues, ses élèves. Paris: Les Éditions Médicales, 1926: 91

Casanova E, Fehsenfeld S, Mantamadiotis T, Lemberger T, Greiner E, Stewart AF, Schütz G. A CamKIIalpha iCre BAC allows brain-specific gene inactivation. *Genesis* 2001; 31: 37-42

Caspi A, Benninger F, Yaari Y. KV7/M channels mediate osmotic modulation of intrinsic neuronal excitability. *J Neurosci* 2009; 29: 11098-11111

Chen C, Westenbroek RE, Xu X, Edwards CA, Sorenson DR, Chen Y, Dyke PM, O'Malley HA, Bharucha V, Meadows LS, Knudsen GA, Vilaythong A, Noebels JL, Saunders TL, Scheuer T, Shrager P, Catterall WA, Isom LL. Mice lacking sodium channel $\beta 1$ subunits display defects in neuronal excitability, sodium channel expression, and nodal architecture. *J Neurosci* 2004; 24: 4030-4042

Chen S, Yue C, Yaari Y. A transitional period of Ca^{2+} -dependent spike afterdepolarization and bursting in developing rat CA1 pyramidal cells. *J Physiol* 2005; 567: 79-93

Chen S, Su H, Yue C, Remy S, Royeck M, Sochivko D, Opitz T, Beck H, Yaari Y. An increase in persistent sodium current contributes to intrinsic neuronal bursting after status epilepticus. *J Neurophysiol* 2011; 105: 117-129

Chen X, Yuan LL, Zhao C, Birnbaum SG, Frick A, Jung WE, Schwarz TL, Sweatt JD, Johnston D. Deletion of Kv4.2 gene eliminates dendritic A-type K^{+} current and enhances induction of long-term potentiation in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J Neurosci* 2006; 26: 12143-12151

Chen Y, Yu FH, Surmeier DJ, Scheuer T, Catterall WA. Neuromodulation of Na^{+} channel slow inactivation via cAMP-dependent protein kinase and protein kinase C. *Neuron* 2006a; 49: 409-420

Chung HJ, Jan YN, Jan LY. Polarized axonal surface expression of neuronal KCNQ channels is mediated by multiple signals in the KCNQ2 and KCNQ3 C-terminal domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 8870-8875

Cingolani LA, Thalhammer A, Yu LMY, Catalano M, Ramos T, Colicos MA, Goda Y. Activity-dependent regulation of synaptic AMPA receptor composition and abundance by $\beta 3$ integrins. *Neuron* 2008; 58: 749-762

Cooper EC. Made for "anchorin": Kv7.2/7.3 (KCNQ2/KCNQ3) channels and the modulation of neuronal excitability in vertebrate axons. *Semin Cell Dev Biol* 2011; 22: 185-192

Crill WE. Persistent sodium current in mammalian central neurons. *Annu Rev Physiol* 1996; 58: 349-362

- Dascal N, Lotan I. Activation of protein kinase C alters voltage dependence of a Na⁺ channel. *Neuron* 1991; 6: 165-175
- Davis GW. Homeostatic control of neural activity: from phenomenology to molecular design. *Annu Rev Neurosci* 2006; 29: 307-323
- Delmas P, Brown DA. Pathways modulating neural KCNQ/M (Kv7) potassium channels. *Nat Rev Neurosci* 2005; 6: 850-862
- Desai NS, Rutherford LC, Turrigiano GG. Plasticity in the intrinsic excitability of cortical pyramidal neurons. *Nat Neurosci* 1999; 2: 515-520
- Devaux JJ, Kleopa KA, Cooper EC, Scherer SS. KCNQ2 is a nodal K⁺ channel. *J Neurosci* 2004; 24: 1236-1244
- Do MTH, Bean BP. Sodium currents in subthalamic nucleus neurons from Nav1.6-null mice. *J Neurophysiol* 2004; 92: 726-733
- Do MTH, Bean BP. Subthreshold sodium currents and pacemaking of subthalamic neurons: modulation by slow inactivation. *Neuron* 2003; 39: 109-120
- Duchen LW, Stefani E. Electrophysiological studies of neuromuscular transmission in hereditary 'motor end-plate disease' of the mouse. *J Physiol* 1971; 212: 535-548
- Duchen LW. Hereditary motor end-plate disease in the mouse: light and electron microscopic studies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1970; 33: 238-250
- Enomoto A, Han JM, Hsiao CF, Chandler SH. Sodium currents in mesencephalic trigeminal neurons from Nav1.6 null mice. *J Neurophysiol* 2007; 98: 710-719
- Fink L, Seeger W, Ermert L, Hänze J, Stahl U, Grimminger F, Kummer W, Bohle RM. Real-time quantitative RT-PCR after laser-assisted cell picking. *Nat Med* 1998; 4: 1329-1333
- French CR, Sah P, Buckett KJ, Gage PW. A voltage-dependent persistent sodium current in mammalian hippocampal neurons. *J Gen Physiol* 1990; 95: 1139-1157
- Fröhlich F, Bazhenov M, Sejnowski TJ. Pathological effect of homeostatic synaptic scaling on network dynamics in diseases of the cortex. *J Neurosci* 2008; 28: 1709-1720

García KD, Sprunger LK, Meisler MH, Beam KG. The sodium channel Scn8a is the major contributor to the postnatal developmental increase of sodium current density in spinal motoneurons. *J Neurosci* 1998; 18: 5234-5239

Garrido JJ, Giraud P, Carlier E, Fernandes F, Moussif A, Fache MP, Dominique D, Dargent B. A targeting motif involved in sodium channel clustering at the axonal initial segment. *Science* 2003; 300: 2091-2094

Gasser A, Ho TSY, Cheng X, Chang KJ, Waxman SG, Rasband MN, Dib-Hajj SD. An ankyrinG-binding motif is necessary and sufficient for targeting Nav1.6 sodium channels to axon initial segments and nodes of Ranvier. *J Neurosci* 2012; 32: 7232-7243

Geiger J, Weber YG, Landwehrmeyer B, Sommer C, Lerche H. Immunohistochemical analysis of KCNQ3 potassium channels in mouse brain. *Neurosci Lett* 2006; 400: 101-104

Goaillard JM, Taylor AL, Schulz DJ, Marder E. Functional consequences of animal-to-animal variation in circuit parameters. *Nat Neurosci* 2009; 12: 1424-1430

Goddard CA, Butts DA, Shatz CJ. Regulation of CNS synapses by neuronal MHC class I. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 6828-6833

Golomb D, Yue C, Yaari Y. Contribution of persistent Na⁺ current and M-type K⁺ current to somatic bursting in CA1 pyramidal cells: combined experimental and modeling study. *J Neurophysiol* 2006; 96: 1912-1926

Goold CP, Nicoll RA. Single-cell optogenetic excitation drives homeostatic synaptic depression. *Neuron* 2010; 68: 512-528

Grubb MS, Burrone J. Activity-dependent relocation of the axon initial segment fine-tunes neuronal excitability. *Nature* 2010; 465: 1070-1074

Hanwell D, Ishikawa T, Saleki R, Rotin D. Trafficking and cell surface stability of the epithelial Na⁺ channel expressed in epithelial Madin-Darby canine kidney cells. *J Biol Chem* 2002; 277: 9772-9779

Hengen KB, Lambo ME, Hooser SDV, Katz DB, Turrigiano GG. Firing rate homeostasis in visual cortex of freely behaving rodents. *Neuron* 2013; 80: 335-342

Holmes FL. Claude Bernard and the milieu interieur. *Arch Int Hist Sci* 1963;16: 369-376

Holmes FL. Origins of the concept of milieu intérieur. In: Grande F, Visscher MB, ed. *Claude Bernard and experimental medicine*. Cambridge (MA): Schenkman; 1967: 171-178

Horn EM, Waldrop TG. Hypoxic augmentation of fast-inactivating and persistent sodium currents in rat caudal hypothalamic neurons. *J Neurophysiol* 2000; 84: 2572-2581

Hu H, Vervaeke K, Storm JF. M-channels (Kv7/KCNQ channels) that regulate synaptic integration, excitability, and spike pattern of CA1 pyramidal cells are located in the perisomatic region. *J Neurosci* 2007; 27: 1853-1867

Huang H, Trussell LO. Control of presynaptic function by a persistent Na(+) current. *Neuron* 2008; 60: 975-979

Ibata K, Sun Q, Turrigiano GG. Rapid synaptic scaling induced by changes in postsynaptic firing. *Neuron* 2008; 57: 819-826

Isaeva E, Hernan A, Isaev D, Holmes GL. Thrombin facilitates seizures through activation of persistent sodium current. *Ann Neurol* 2012; 72: 192-198

Jarsky T, Mady R, Kennedy B, Spruston N. Distribution of bursting neurons in the CA1 region and the subiculum of the rat hippocampus. *J Comp Neurol* 2008; 506: 535-547

Jentsch TJ. Neuronal KCNQ potassium channels: physiology and role in disease. *Nat Rev Neurosci* 2000; 1: 21-30

Jones RT, Faas GC, Mody I. Intracellular Bicarbonate Regulates Action Potential Generation via KCNQ Channel Modulation. *J Neurosci* 2014; 34: 4409-4417

Jugloff DG, Khanna R, Schlichter LC, Jones OT. Internalization of the Kv1.4 potassium channel is suppressed by clustering interactions with PSD-95. *J Biol Chem* 2000; 275: 1357-1364

Jung HY, Staff NP, Spruston N. Action potential bursting in subicular pyramidal neurons is driven by a calcium tail current. *J Neurosci* 2001; 21: 3312-3321

Katz LC, Shatz CJ. Synaptic activity and the construction of cortical circuits. *Science* 1996; 274: 1133-1138

- Kazen-Gillespie KA, Ragsdale DS, D'Andrea MR, Mattei LN, Rogers KE, Isom LL. Cloning, localization, and functional expression of sodium channel beta1A subunits. *J Biol Chem* 2000; 275: 1079-1088
- Kearney JA, Yang Y, Beyer B, Bergren SK, Claes L, Dejonghe P, Frankel WN. Severe epilepsy resulting from genetic interaction between *Scn2a* and *Kcnq2*. *Hum Mol Genet* 2006; 15: 1043-1048
- Kepecs A, Lisman J. Information encoding and computation with spikes and bursts. *Network* 2003; 14: 103-118
- Khorkova O, Golowasch J. Neuromodulators, not activity, control coordinated expression of ionic currents. *J Neurosci* 2007; 27: 8709-8718
- Kohrman DC, Harris JB, Meisler MH. Mutation detection in the *med* and *medJ* alleles of the sodium channel *Scn8a*. Unusual splicing due to a minor class AT-AC intron. *J Biol Chem* 1996; 271: 17576-17581
- Kuba H, Oichi Y, Ohmori H. Presynaptic activity regulates Na(+) channel distribution at the axon initial segment. *Nature* 2010; 465: 1075-1078
- Li M, West JW, Lai Y, Scheuer T, Catterall WA. Functional modulation of brain sodium channels by cAMP-dependent phosphorylation. *Neuron* 1992; 8: 1151-1159
- Liao Y, Deprez L, Maljevic S, Pitsch J, Claes L, Hristova D, Jordanova A, Ala-Mello S, Bellan-Koch A, Blazevic D, Schubert S, Thomas EA, Petrou S, Becker AJ, De Jonghe P, Lerche H. Molecular correlates of age-dependent seizures in an inherited neonatal-infantile epilepsy. *Brain* 2010; 133: 1403-1414
- Lisman J, Yasuda R, Raghavachari S. Mechanisms of CaMKII action in long-term potentiation. *Nat Rev Neurosci* 2012; 13: 169-182
- Ma JY, Catterall WA, Scheuer T. Persistent sodium currents through brain sodium channels induced by G protein betagamma subunits. *Neuron* 1997; 19: 443-452
- Ma JY, Li M, Catterall WA, Scheuer T. Modulation of brain Na⁺ channels by a G-protein-coupled pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91: 12351-12355

MacLean JN, Zhang Y, Johnson BR, Harris-Warrick RM. Activity-independent homeostasis in rhythmically active neurons. *Neuron* 2003; 37: 109-120

Magee JC, Carruth M. Dendritic voltage-gated ion channels regulate the action potential firing mode of hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J Neurophysiol* 1999; 82: 1895-1901

Malenka RC. Synaptic plasticity in the hippocampus: LTP and LTD. *Cell* 1994; 78: 535-538

Marder E, Goaillard JM. Variability, compensation and homeostasis in neuron and network function. *Nat Rev Neurosci* 2006; 7: 563-574

Marder E. Variability, compensation, and modulation in neurons and circuits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108: 15542-15548

Mayford M, Bach ME, Huang YY, Wang L, Hawkins RD, Kandel ER. Control of memory formation through regulated expression of a CaMKII transgene. *Science* 1996; 274: 1678-1683

Metz AE, Jarsky T, Martina M, Spruston N. R-type calcium channels contribute to afterdepolarization and bursting in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J Neurosci* 2005; 25: 5763-5773

Metz AE, Spruston N, Martina M. Dendritic D-type potassium currents inhibit the spike afterdepolarization in rat hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J Physiol* 2007; 58: 175-187

Muraro NI, Weston AJ, Gerber AP, Luschnig S, Moffat KG, Baines RA. Pumilio binds para mRNA and requires Nanos and Brat to regulate sodium current in *Drosophila* motoneurons. *J Neurosci* 2008; 28: 2099-2109

Negro CAD, Koshiya N, Butera RJ, Smith JC. Persistent sodium current, membrane properties and bursting behavior of pre-bötzinger complex inspiratory neurons in vitro. *J Neurophysiol* 2002; 88: 2242-2250

Nelson SB, Turrigiano GG. Strength through diversity. *Neuron* 2008; 60: 477-482

Nerbonne JM, Gerber BR, Norris A, Burkhalter A. Electrical remodelling maintains firing properties in cortical pyramidal neurons lacking KCND2-encoded A-type K⁺ currents. *J Physiol* 2008; 586: 1565-1579

Numann R, Catterall WA, Scheuer T. Functional modulation of brain sodium channels by protein kinase C phosphorylation. *Science* 1991; 254: 115-118

O'Leary T, Williams AH, Caplan JS, Marder E. Correlations in ion channel expression emerge from homeostatic tuning rules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; 110: E2645-E2654

Pan Z, Kao T, Horvath Z, Lemos J, Sul JY, Cranstoun SD, Bennett V, Scherer SS, Cooper EC. A common ankyrin-G-based mechanism retains KCNQ and NaV channels at electrically active domains of the axon. *J Neurosci* 2006; 26: 2599-2613

Peters HC, Hu H, Pongs O, Storm JF, Isbrandt D. Conditional transgenic suppression of M channels in mouse brain reveals functions in neuronal excitability, resonance and behavior. *Nat Neurosci* 2005; 8: 51-60

Prinz AA. Computational exploration of neuron and neural network models in neurobiology. *Methods Mol Biol* 2007; 401: 167-179

Qu Y, Curtis R, Lawson D, Gilbride K, Ge P, DiStefano PS, Silos-Santiago I, Catterall WA, Scheuer T. Differential modulation of sodium channel gating and persistent sodium currents by the beta1, beta2, and beta3 subunits. *Mol Cell Neurosci* 2001; 18: 570-580

Queenan BN, Lee KJ, Pak DTS. Wherefore art thou, homeo(stasis)? Functional diversity in homeostatic synaptic plasticity. *Neural Plast* 2012; Article ID 718203

Raman IM, Sprunger LK, Meisler MH, Bean BP. Altered subthreshold sodium currents and disrupted firing patterns in Purkinje neurons of Scn8a mutant mice. *Neuron* 1997; 19: 881-891

Ramocki MB, Zoghbi HY. Failure of neuronal homeostasis results in common neuropsychiatric phenotypes. *Nature* 2008; 455: 912-918

- Rasmussen HB, Frøkjær-Jensen C, Jensen CS, Jensen HS, Jørgensen NK, Misonou H, Trimmer JS, Olesen SP, Schmitt N. Requirement of subunit co-assembly and ankyrin-G for M-channel localization at the axon initial segment. *J Cell Sci* 2007; 120: 953-963
- Royeck M, Horstmann MT, Remy S, Reitze M, Yaari Y, Beck H. Role of axonal Nav1.6 sodium channels in action potential initiation of CA1 pyramidal neurons. *J Neurophysiol* 2008; 100: 2361-2380
- Rutherford LC, Nelson SB, Turrigiano GG. BDNF has opposite effects on the quantal amplitude of pyramidal neuron and interneuron excitatory synapses. *Neuron* 1998; 21: 521–530
- Schroeder BC, Hechenberger M, Weinreich F, Kubisch C, Jentsch TJ. KCNQ5, a novel potassium channel broadly expressed in brain, mediates M-type currents. *J Biol Chem* 2000; 275: 24089-24095
- Schroeder BC, Kubisch C, Stein V, Jentsch TJ. Moderate loss of function of cyclic-AMP-modulated KCNQ2/KCNQ3 K⁺ channels causes epilepsy. *Nature* 1998; 396: 687-690
- Schulz DJ, Goillard JM, Marder E. Variable channel expression in identified single and electrically coupled neurons in different animals. *Nat Neurosci* 2006; 9: 356-362
- Schulz DJ, Goillard JM, Marder EE. Quantitative expression profiling of identified neurons reveals cell-specific constraints on highly variable levels of gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 13187-13191
- Schweitzer P. Cannabinoids decrease the K(+) M-current in hippocampal CA1 neurons. *J Neurosci* 2000; 20: 51-58
- Schwindt PC, Crill WE. Amplification of synaptic current by persistent sodium conductance in apical dendrite of neocortical neurons. *J Neurophysiol* 1995; 74: 2220-2224
- Seeburg DP, Feliu-Mojer M, Gaiottino J, Pak DTS, Sheng M. Critical role of CDK5 and Polo-like kinase 2 in homeostatic synaptic plasticity during elevated activity. *Neuron* 2008; 58: 571-583

Sekerli M, Negro CAD, Lee RH, Butera RJ. Estimating action potential thresholds from neuronal time-series: new metrics and evaluation of methodologies. *IEEE Trans Biomed Eng* 2004; 51: 1665-1672

Shah MM, Migliore M, Valencia I, Cooper EC, Brown DA. Functional significance of axonal Kv7 channels in hippocampal pyramidal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 7869-7874

Shepherd JD, Rumbaugh G, Wu J, Chowdhury S, Plath N, Kuhl D, Huganir RL, Worley PF. Arc/Arg3.1 mediates homeostatic synaptic scaling of AMPA receptors. *Neuron* 2006; 52: 475-484

Shirahata E, Iwasaki H, Takagi M, Lin C, Bennett V, Okamura Y, Hayasaka K. Ankyrin-G regulates inactivation gating of the neuronal sodium channel, Nav1.6. *J Neurophysiol* 2006; 96: 1347-1357

Staub O, Gautschi I, Ishikawa T, Breitschopf K, Ciechanover A, Schild L, Rotin D. Regulation of stability and function of the epithelial Na⁺ channel (ENaC) by ubiquitination. *EMBO J* 1997; 16: 6325-6336

Steinmetz CC, Turrigiano GG. Tumor necrosis factor- α signaling maintains the ability of cortical synapses to express synaptic scaling. *J Neurosci* 2010; 30: 14685-14690

Stellwagen D, Malenka RC. Synaptic scaling mediated by glial TNF- α . *Nature* 2006; 440: 1054-1059

Stemmler M, Koch C. How voltage-dependent conductances can adapt to maximize the information encoded by neuronal firing rate. *Nat Neurosci* 1999; 2: 521-527

Suh BC, Hille B. PIP2 is a necessary cofactor for ion channel function: how and why? *Annu Rev Biophys* 2008; 37: 175-195

Swensen AM, Bean BP. Robustness of burst firing in dissociated purkinje neurons with acute or long-term reductions in sodium conductance. *J Neurosci* 2005; 25: 3509-3520

Tazerart S, Vinay L, Brocard F. The persistent sodium current generates pacemaker activities in the central pattern generator for locomotion and regulates the locomotor rhythm. *J Neurosci* 2008; 28: 8577-8589

Temporal S, Desai M, Khorkova O, Varghese G, Dai A, Schulz DJ, Golowasch J. Neuromodulation independently determines correlated channel expression and conductance levels in motor neurons of the stomatogastric ganglion. *J Neurophysiol* 2012; 107: 718-727

Tobin AE, Cruz-Bermúdez ND, Marder E, Schulz DJ. Correlations in ion channel mRNA in rhythmically active neurons. *PLoS One* 2009; 4: e6742

Trasande CA, Ramirez JM. Activity deprivation leads to seizures in hippocampal slice cultures: is epilepsy the consequence of homeostatic plasticity? *J Clin Neurophysiol* 2007; 24: 154-164

Turrigiano G, Abbott LF, Marder E. Activity-dependent changes in the intrinsic properties of cultured neurons. *Science* 1994; 264: 974-977

Turrigiano G, LeMasson G, Marder E. Selective regulation of current densities underlies spontaneous changes in the activity of cultured neurons. *J Neurosci* 1995; 15: 3640-3652

Turrigiano GG, Leslie KR, Desai NS, Rutherford LC, Nelson SB. Activity-dependent scaling of quantal amplitude in neocortical neurons. *Nature* 1998; 391: 892-896

Turrigiano GG, Nelson SB. Homeostatic plasticity in the developing nervous system. *Nat Rev Neurosci* 2004; 5: 97-107

Turrigiano GG. Homeostatic plasticity in neuronal networks: the more things change, the more they stay the same. *Trends Neurosci* 1999; 22: 221-227

Turrigiano GG. More than a sidekick: glia and homeostatic synaptic plasticity. *Trends Mol Med* 2006; 12: 458-460

Turrigiano GG. The self-tuning neuron: synaptic scaling of excitatory synapses. *Cell* 2008; 135: 422-435

Uebachs M, Opitz T, Royeck M, Dickhof G, Horstmann MT, Isom LL, Beck H. Efficacy loss of the anticonvulsant carbamazepine in mice lacking sodium channel beta subunits via paradoxical effects on persistent sodium currents. *J Neurosci* 2010; 30: 8489-8501

- Vreugdenhil M, Hoogland G, van Veelen CWM, Wadman WJ. Persistent sodium current in subicular neurons isolated from patients with temporal lobe epilepsy. *Eur J Neurosci* 2004; 19: 2769-2778
- Wang HS, Pan Z, Shi W, Brown BS, Wymore RS, Cohen IS, Dixon JE, McKinnon D. KCNQ2 and KCNQ3 potassium channel subunits: molecular correlates of the M-channel. *Science* 1998; 282: 1890-1893
- Wart AV, Matthews G. Impaired firing and cell-specific compensation in neurons lacking Nav1.6 sodium channels. *J Neurosci* 2006; 26: 7172-7180
- Wart AV, Matthews G. Expression of sodium channels Nav1.2 and Nav1.6 during postnatal development of the retina. *Neurosci Lett* 2006a; 403: 315-317
- Weber YG, Geiger J, Kämpchen K, Landwehrmeyer B, Sommer C, Lerche H. Immunohistochemical analysis of KCNQ2 potassium channels in adult and developing mouse brain. *Brain Res* 2006; 1077: 1-6
- Wimmer VC, Reid CA, Mitchell S, Richards KL, Scaf BB, Leaw BT, Hill EL, Royeck M, Horstmann MT, Cromer BA, Davies PJ, Xu R, Lerche H, Berkovic SF, Beck H, Petrou S. Axon initial segment dysfunction in a mouse model of genetic epilepsy with febrile seizures plus. *J Clin Invest* 2010; 120: 2661-2671
- Yu LMY, Goda Y. Dendritic signalling and homeostatic adaptation. *Curr Opin Neurobiol* 2009; 19: 327-335
- Yue C, Remy S, Su H, Beck H, Yaari Y. Proximal persistent Na⁺ channels drive spike afterdepolarizations and associated bursting in adult CA1 pyramidal cells. *J Neurosci* 2005; 25: 9704-9720
- Yue C, Yaari Y. Axo-somatic and apical dendritic Kv7/M channels differentially regulate the intrinsic excitability of adult rat CA1 pyramidal cells. *J Neurophysiol* 2006; 95: 3480-3495
- Yue C, Yaari Y. KCNQ/M channels control spike afterdepolarization and burst generation in hippocampal neurons. *J Neurosci* 2004; 24: 4614-4624
- Zhang W, Linden DJ. The other side of the engram: experience-driven changes in neuronal intrinsic excitability. *Nat Rev Neurosci* 2003; 4: 885-900

Zhou D, Lambert S, Malen PL, Carpenter S, Boland LM, Bennett V. AnkyrinG is required for clustering of voltage-gated Na channels at axon initial segments and for normal action potential firing. *J Cell Biol* 1998; 143: 1295-1304